

10-
66-

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of
the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

"BÉ"



PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 6 :
C12N 15/12, C07K 14/715, C12N 15/85,
5/10, C12Q 1/68, C12N 15/11, G01N
33/53, C07K 16/28, G01N 33/577, 33/68,
A61K 38/17

A1

(11) Numéro de publication internationale: WO 97/20926

(43) Date de publication internationale: 12 juin 1997 (12.06.97)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01756

(22) Date de dépôt international: 7 novembre 1996 (07.11.96)

(30) Données relatives à la priorité:
95/14424 6 décembre 1995 (06.12.95) FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SANOFI
[FR/FR]; 32-34, rue Marbeuf, F-75008 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CAPUT, Daniel
[FR/FR]; La Bousquière, F-31290 Avignolet-Lauragais
(FR). FERRARA, Pascual [AR/FR]; Libouille Saint-
Assiscle, F-31290 Avignolet-Lauragais (FR). LAURENT,
Patrick [FR/FR]; Chemin Calmontais, "Clochettes",
F-31190 Auterive (FR). VITA, Natalio [IT/FR]; 45 bis,
chemin Al-Cers, F-31450 Montgiscard (FR).

(74) Mandataire: I.E. GUEN, Gérard; Cabinet Lavoix, 2, place
d'Estienne-d'Orves, F-75441 Paris Cédex 09 (FR).

(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY,
CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU,
IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG,
US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG),
brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB,
GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.
Avec revendications modifiées.

(54) Title: IL-13 RECEPTOR POLYPEPTIDE

(54) Titre: POLYPEPTIDE RECEPTEUR DE L'IL-13

(57) Abstract

A purified polypeptide including an amino acid sequence selected from (a) SEQ ID no. 2, and (b) any biologically active sequence derived from SEQ ID no. 2, is disclosed.

(57) Abrégé

Cette invention a pour objet un polypeptide purifié, comprenant une séquence d'acides aminés choisie parmi: a) la séquence SEQ ID n°2, b) toute séquence biologiquement active dérivée de SEQ ID n°2.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BH	Brsil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LJ	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Liberia	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

Polypeptide récepteur de l'IL-13

La présente invention concerne des polypeptides purifiés ayant une activité de récepteur spécifique de l'interleukine 13 (IL-13), leurs fragments biologiquement actifs et les séquences d'acides nucléiques correspondantes, et leurs applications.

L'IL-13 est une cytokine de 112 acides aminés récemment identifiée (1,2), sécrétée
5 par des lymphocytes T activés, les lymphocytes B et les mastocytes après activation.

De par ses nombreuses propriétés biologiques communes avec l'IL-4, l'IL-13 a été décrite comme étant une cytokine "IL-4-like". Ses activités sont en effet similaires à celles de l'IL-4 sur les cellules B (3-5), les monocytes (6-10) et autres cellules
10 non hématopoïétiques (11-12). En revanche, contrairement à l'IL-4, elle n'exercerait pas d'effet particulier sur des cellules T au repos ou activées (13).

Les différentes activités biologiques de l'IL-13 sur les monocytes/macrophages, les lymphocytes B et certains précurseurs hématopoïétiques ont été décrites en détail par A.J. Minty, ainsi que dans des articles de revues sur l'IL-13 (voir par ex. 14).
15 Plusieurs données indiquent en outre que cette cytokine a un effet pleiotrope sur d'autres types cellulaires. Ces cellules non-hématopoïétiques affectées directement par l'IL-13 sont des cellules endothéliales et microgliales, des kératinocytes, et des carcinomes de rein et de colon.

Les activités anti-inflammatoires et immunorégulatrices de l'IL-13 peuvent être
20 utiles par exemple dans le traitement des pathologies auto-immunes, tumorales et virales.

Une mise à profit de ces propriétés biologiques au plan clinique nécessite toutefois une parfaite connaissance des signaux et mécanismes par lesquels ces effets sont exercés, de façon à pouvoir les contrôler et les moduler dans les pathologies

25 concernées.

L'une des étapes dans l'analyse du signal transmis par une molécule biologique au sein d'une cellule, consiste à identifier son récepteur membranaire. Les travaux réalisés à cet effet sur le récepteur de l'IL-13 ont montré que l'IL-13 et l'IL-4 avaient en commun un récepteur, ou tout au moins certains des composants d'un

complexe récepteur, ainsi que des éléments de transduction de signaux (15-18). Ce récepteur est présent à la surface de différents types cellulaires, en nombre variable selon le type cellulaire considéré. La distribution comparative des récepteurs de l'IL-13 et de l'IL-4 a été indiquée par A.J. Minty (14).

- 5 Kondo et al. (19) ont décrit la structure d'un récepteur de haute affinité pour l'IL-4. Celui-ci est un dimère, formé par l'association d'une glycoprotéine de 140 kDa (IL-4R) et de la chaîne γ du récepteur de l'IL-2 (γc). L'IL-4 peut se lier à la sous-unité glycoprotéique de 140 kDa (IL-4R ou gp 140) avec une bonne affinité (Kd comprise entre 50 et 100 pM) (15). Cependant, cette affinité est augmentée d'un
- 10 facteur 2 à 3, lorsque la chaîne γc est associée à la gp 140. Cette association est en outre nécessaire à la transmission de certains signaux médiés par l'IL-4 (19,20).

- Des expériences de compétition croisée pour la liaison, soit de l'IL-13, soit de l'IL-4, ont démontré que l'IL-4 peut normalement empêcher la liaison de l'IL-13, alors
- 15 que l'IL-13 ne peut généralement empêcher que partiellement la liaison de l'IL-4 à son récepteur (17,21), et ne se fixe sur aucune des deux sous-unités du récepteur de l'IL-4, ni sur le complexe formé par leur association. Sur la base de ces observations, les auteurs de la présente invention ont supposé que le récepteur spécifique de l'IL-13 était constitué du complexe récepteur IL-4 associé avec un
- 20 autre composant liant l'IL-13, (IL-13R β).

- Des travaux réalisés sur une lignée cellulaire érythroleucémique capable de proliférer en réponse à l'IL-13 et à l'IL-4 (lignée TF-1), leur ont permis de montrer que ces deux cytokines produisaient des événements intracellulaires similaires après fixation sur leur récepteur (18). En parallèle, des expériences de pontage
- 25 ("cross-link") leur ont permis de montrer que la gp 140 pouvait former des hétérodimères soit avec la chaîne γ , soit avec une nouvelle sous-unité, d'un poids moléculaire de 55 à 70 kDa (17,21).

D'autre part des travaux réalisés récemment sur une lignée de cellules souches embryonnaires de souris ont permis d'isoler l'ADN génomique et l'ADNc

encodant pour un polypeptide de 424 résidus d'acides aminés (IL-13R α),
suggérant que le récepteur de l'IL-13 partageait avec le récepteur de l'IL-4 une
chaîne commune pour constituer un récepteur à haute affinité (22,23), c'est-à-dire
présente une affinité dont la constante K_d est située entre des valeurs comprises
5 entre 10 pM et 100 pM environ (un récepteur de basse affinité présentant une
constante K_d située entre des valeurs comprises entre 2nM et 10 nM).

Compte tenu de l'importance au plan médical de la compréhension fine des
phénomènes de régulation de l'IL-4 et de l'IL-13, et en particulier de la possibilité
de pouvoir séparer et contrôler isolément les effets produits par l'une ou l'autre de
10 ces deux cytokines, les auteurs de la présente invention se sont intéressés, d'une
part, à la caractérisation d'un polypeptide liant spécifiquement l'IL-13 avec une
haute affinité et, d'autre part, à la caractérisation d'un autre polypeptide qui, seul,
lie spécifiquement l'IL-13 avec une basse affinité et qui, s'il est associé avec le
récepteur de l'IL-4, constitue un récepteur de haute affinité pour l'IL-13.

15 Ceux-ci ont à présent identifié une lignée cellulaire de carcinome humain exprimant
le récepteur spécifique de l'IL-13 en quantité plus importante que d'autres lignées
de carcinome rénal humaines connues (21), et ont réalisé le clonage de la sous-
unité primaire responsable de la fixation de l'IL-13 sur le récepteur de l'IL-4/IL-13,
dénommée IL-13 R β , ainsi que le clonage de la chaîne commune que partage le
20 récepteur de l'IL-13 et le récepteur de l'IL-4 pour constituer un récepteur de haute
affinité permettant une compétition croisée des 2 cytokines, dénommée IL-13R α .
La présente invention concerne donc des polypeptides purifiés liant spécifiquement
l'IL-13.

Plus particulièrement, l'invention a pour objet des polypeptides purifiés dont les
25 séquences d'acides aminés correspondent à celle d'un récepteur spécifique de l'IL-
13 (IL-13R β et IL-13R α), ou des fragments biologiquement actifs de ceux-ci.
L'invention a également pour objet des séquences d'ADN isolées codant pour
lesdits polypeptides ou leurs fragments biologiquement actifs.

Elle vise en outre les vecteurs d'expression contenant au moins l'une des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, et les cellules hôtes transfectées par ces vecteurs d'expression dans des conditions permettant la réplication et/ou l'expression de l'une desdites séquences nucléotidiques.

- 5 Les méthodes de production de l'IL-13R β et de l'IL-13R α recombinants ou de leurs fragments biologiquement actifs par les cellules hôtes transfectées font également partie de l'invention.

- L'invention comprend également des compositions pharmaceutiques comprenant l'IL-13R β ou/et l'IL-13R α ou des fragments biologiquement actifs de ceux-ci pour
10 la régulation des mécanismes immunologiques et inflammatoires produits par l'IL-13. Elle vise en outre une méthode pour l'identification d'agents capables de moduler l'activité de l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α , et l'utilisation de l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α ou de fragments de ceux-ci pour le criblage de ces agents ainsi que pour la fabrication de nouveaux produits capables de moduler l'activité du
15 récepteur de l'IL-13.

L'invention comprend également des anticorps ou des dérivés d'anticorps spécifiques de l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α .

- Elle vise enfin une méthode de traitement thérapeutique pour moduler les réactions immunologiques médiées par l'IL-13, comprenant l'administration à un patient de
20 l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α ou d'un de leurs fragments biologiquement actif ou d'un composé capable de moduler spécifiquement l'activité de ce récepteur, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Dans la description de l'invention ci-après, on utilise les définitions suivantes :

- polypeptide liant spécifiquement l'IL-13 avec une haute affinité (IL-13R β) : un
25 polypeptide comprenant la séquence d'acides aminés SEQ ID n° 2 ou tout fragment ou dérivé de celui-ci biologiquement actif ;
- polypeptide qui, seul, lie spécifiquement l'IL-13 avec une basse affinité et qui, s'il est associé avec le récepteur de l'IL-4, constitue un récepteur de haute affinité

- (IL-13R α) : un polypeptide comprenant la séquence d'acides aminés SEQ ID N° 4 ou tout fragment ou dérivé de celui-ci biologiquement actif ;
- biologiquement actif : capable de se lier spécifiquement à l'IL-13 et/ou de participer à la transduction du signal spécifiquement produit par l'IL-13 au niveau de la membrane cellulaire, et/ou capable d'interagir avec le récepteur spécifique de l'IL-4 (IL-4R/gp 140) pour former un complexe capable de lier l'IL-4 et l'IL-13, et/ou qui est reconnu par des anticorps spécifiques du polypeptide de séquence SEQ ID n° 2 ou/et de séquence SEQ ID n° 4, et/ou capable d'induire des anticorps qui reconnaissent le polypeptide de séquence SEQ ID n° 2 ou/et de séquence SEQ ID n° 4 ;
 - dérivé : tout polypeptide variant du polypeptide de séquence SEQ ID n° 2 ou/et de séquence SEQ ID n° 4, ou toute molécule résultant d'une modification de nature génétique et/ou chimique de la séquence SEQ ID n° 2 ou de séquence SEQ ID n° 4, c'est-à-dire obtenue par mutation, délétion, addition, substitution et/ou modification chimique d'un seul ou d'un nombre limité d'acides aminés, ainsi que toute séquence isoforme, c'est-à-dire une séquence identique à la séquence SEQ ID n° 2 ou à la séquence SEQ ID n° 4, à l'un de leurs fragments ou à l'une de leurs séquences modifiées, contenant un ou plusieurs acides aminés sous la forme d'énantiomère D, lesdites séquences variantes, modifiées ou isoformes ayant conservé au moins l'une des propriétés les rendant biologiquement actives.

La présente invention a pour objet un polypeptide purifié, comprenant une séquence d'acides aminés choisie parmi :

- a) la séquence SEQ ID n° 2 ou la séquence SEQ ID n° 4,
- b) toute séquence biologiquement active dérivée de SEQ ID n° 2 ou de SEQ ID n° 4, selon la définition donnée précédemment.

La fabrication de dérivés peut avoir différents objectifs, dont en particulier celui d'augmenter l'affinité du récepteur pour l'IL-13, celui de moduler la compétition

croisée entre l'IL-13 et l'IL-4, celui d'améliorer leurs taux de production, d'augmenter leur résistance à des protéases, de modifier leur activité biologique ou de leur conférer de nouvelles propriétés pharmaceutiques et/ou biologiques.

5 Parmi des variants biologiquement actifs des polypeptides tels que définis précédemment, on préfère les fragments produits par épissage alternatif des trans-crypts (ARN messagers) du gène codant pour l'une des séquences d'acides aminés décrites ci-dessus.

Dans une variante avantageuse, les 8 acides aminés C-terminaux du polypeptide de séquence SEQ ID n° 2 sont substitués par les 6 acides aminés suivants :

10 VRCVTL.

Selon un autre aspect avantageux, l'invention vise une forme soluble de l'IL-13R β , dénommée IL-13R β s, comprenant notamment le domaine extra-cellulaire du polypeptide de séquence SEQ ID n° 2 s'étendant jusqu'au résidu 343 et préférentiellement jusqu'au résidu 337 ainsi qu'une forme soluble de l'IL-13R α ,

15 dénommée IL-13R α s, comprenant notamment le domaine extracellulaire du polypeptide de séquence ID n°4 s'étendant jusqu'au résidu 343 et préférentiellement jusqu'aux résidus compris entre 336 et 342.

20 Le polypeptide qui comprend la séquence SEQ ID n° 2 ou la séquence SEQ ID n°4 représente un mode de réalisation particulier de l'invention. Comme cela apparaîtra dans les exemples, ce polypeptide peut être exprimé à la surface de cellules humaines pour former un récepteur de l'IL-13 fonctionnel ou s'associer avec le récepteur de l'IL-4 pour former, avec la chaîne γ du récepteur de l'IL-2 le complexe récepteur commun à l'IL-4 et l'IL-13.

25 La présente invention a également pour objet une séquence d'acides nucléiques isolée, choisie parmi:

- a) la séquence SEQ ID n° 1,
- b) la séquence SEQ ID n°3,

- 5 c) les séquences d'acides nucléiques capables de s'hybrider à la séquence SEQ ID n° 1 ou à la séquence SEQ ID n°3, ou à leurs séquences complémentaires et codant pour des polypeptides ayant une activité de récepteur de l'IL-13, ou permettant de reconstituer un récepteur de haute affinité pour l'IL-13 et l'IL-4,
- d) les séquences d'acides nucléiques dérivées des séquences a) et b) et c) du fait de la dégénérescence du code génétique.

10 Plus particulièrement, l'invention a pour objet une séquence codant pour la partie soluble de l'IL-13R β ou de l'IL-13R α et tout variant produit par épissage alternatif des transcripts de l'IL-13R β ou de l'IL-13R α , conservant au moins une des propriétés biologiques décrites.

15 Un mode de réalisation préféré est représenté par une séquence d'acides nucléiques comprenant ou constituée par l'enchaînement de nucléotides s'étendant du nucléotide n° 1 jusqu'au nucléotide 1081, et préférentiellement jusqu'au nucléotide 1063 sur la séquence SEQ ID n° 1.

20 Un autre mode de réalisation préféré est représenté par une séquence d'acides nucléiques comprenant ou constitué par l'enchaînement de nucléotides s'étendant du nucléotide n°1 jusqu'au nucléotide n° 1059, et préférentiellement jusqu'aux nucléotides compris entre les numéros 1041 et 1056 sur la séquence SEQ ID n° 3. Avantagusement, la séquence d'acides nucléiques selon l'invention est une séquence codant pour une protéine correspondant à la forme mature de l'IL-13R β ou de l'IL-13R α , cette protéine mature étant le résultat de la libération du peptide signal.

25 Les différentes séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être d'origine artificielle ou non. Il peut s'agir de séquences d'ADN ou d'ARN, obtenues par criblage de banques de séquences au moyen de sondes élaborées sur la base de la séquence SEQ ID n° 1 ou de la séquence SEQ ID n°3. De telles banques peuvent

être préparées par des techniques classiques de biologie moléculaire, connues de l'homme de l'art.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent également être préparées par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage des banques.

5 Ces séquences nucléotidiques permettent la réalisation de sondes nucléotidiques, codant pour un polypeptide selon l'invention ou un fragment biologiquement actif de celui-ci. Les conditions d'hybridation appropriées correspondent aux conditions de température et de force ionique usuellement utilisées par l'homme du métier, de
10 préférence à des conditions de température comprises entre (T_m moins 5°C) et (T_m moins 30°C) et de préférence encore, à des conditions de température comprises entre (T_m moins 5°C) et (T_m moins 10°C) (forte stringence), T_m étant la température de fusion, définie comme étant la température à laquelle 50 % des brins appariés se séparent. De telles sondes font également partie de l'invention.
15 Elles peuvent être utilisées comme outil de diagnostic *IN VITRO* pour la détection, par des expériences d'hybridation, de transcripts spécifiques des polypeptides de l'invention dans des échantillons biologiques ou pour la mise en évidence de synthèses aberrantes ou d'anomalies génétiques résultant d'un polymorphisme, de mutations ou d'un mauvais épissage.

20 Les sondes de l'invention comportent au minimum 10 nucléotides, et au maximum comportent la totalité de la séquence nucléotidique SEQ ID n° 1 ou de SEQ ID n°3 ou de leur brin complémentaire.

Parmi les sondes les plus courtes, c'est-à-dire d'environ 10 à 15 nucléotides, les conditions d'hybridation appropriées correspondent aux conditions de température
25 et de force ionique usuellement utilisées par l'homme du métier.

Préférentiellement, les sondes de l'invention sont marquées, préalablement à leur utilisation. Pour cela, plusieurs techniques sont à la portée de l'homme du métier comme par exemple le marquage fluorescent, radioactif, chimioluminescent ou enzymatique.

Les méthodes de diagnostic *IN VITRO* dans lesquelles ces sondes nucléotidiques sont mises en oeuvre pour la détection de synthèses aberrantes ou d'anomalies génétiques, telles que la perte d'hétérozygotie et le réarrangement génétique, au niveau des séquences nucléiques codant pour un polypeptide récepteur de l'IL-13 ou un fragment biologiquement actif, sont incluses dans la présente invention. Un

5 tel type de méthode comprend :

- la mise en contact d'une sonde nucléotidique de l'invention avec un échantillon biologique dans des conditions permettant la formation d'un complexe d'hybridation entre ladite sonde et la susdite séquence nucléotidique, éventuellement
- 10 après une étape préalable d'amplification de la susdite séquence nucléotidique ;
- la détection du complexe d'hybridation éventuellement formé ;
- éventuellement le séquençage de la séquence nucléotidique formant le complexe d'hybridation avec la sonde de l'invention.

Les sondes d'ADNc de l'invention sont en outre avantageusement utilisables pour

15 la détection d'anomalies chromosomiques.

Les séquences nucléotidiques de l'invention sont également utiles pour la fabrication et l'utilisation d'amorces oligonucléotidiques sens et/ou antisens pour des réactions de séquençage ou d'amplification spécifique selon la technique dite de PCR (réaction de polymérisation en chaîne) ou toute autre variante de celle-ci.

20 Les séquences nucléotidiques selon l'invention ont par ailleurs des utilisations dans le domaine thérapeutique, pour la réalisation de séquences antisens, capables de s'hybrider spécifiquement avec une séquence d'acides nucléiques, y compris un ARN messenger, utilisables en thérapie génique. L'invention a ainsi pour objet des séquences antisens capables d'inhiber, au moins partiellement, la production de

25 polypeptides récepteurs de l'IL-13, tels que définis précédemment. De telles séquences sont avantageusement constituées par celles qui constituent le cadre de lecture codant pour l'IL-13R β ou l'IL-13R α au niveau du transcript. Elles sont plus particulièrement utilisables dans le traitement des allergies et de l'inflammation.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent par ailleurs être utilisées pour la production de polypeptides recombinants ayant une activité de récepteur de l'IL-13, tels que précédemment définis.

5 Ces polypeptides peuvent être produits à partir des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, selon des techniques de production de produits recombinants connues de l'homme du métier. Dans ce cas, la séquence nucléotidique utilisée est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire. L'hôte cellulaire utilisé peut être choisi parmi des systèmes procaryotes, comme les bactéries, ou eucaryotes, comme par exemple les levures, cellules d'insectes,
10 CHO (cellules d'ovaires de hamster chinois) ou tout autre système avantageusement disponible dans le commerce. Un hôte cellulaire préféré pour l'expression des polypeptides de l'invention est constitué par la lignée fibroblastique COS-7 ou COS-3.

Les signaux contrôlant l'expression des polypeptides, tels que les promoteurs, les
15 activateurs ou les séquences de terminaison, sont choisis en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être insérées dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi. De tels vecteurs seront préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant
20 peuvent être introduits dans un hôte approprié par des méthodes standard, telles que par exemple l'électroporation.

Les vecteurs d'expression contenant au moins l'une des séquences nucléotidiques définies ci-dessus font également partie de la présente invention.

Dans le cas des cellules COS-7 ou COS-3 la transfection peut être réalisée à partir
25 du vecteur pSE-1, comme décrit dans (17).

L'invention vise en outre les cellules hôtes transfectées par ces vecteurs d'expression. Ces cellules peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus,

puis la mise en culture desdites cellules dans des conditions permettant la réplication et/ou l'expression de la séquence nucléotidique transfectée.

Ces cellules sont utilisables dans une méthode de production d'un polypeptide recombinant de séquence SEQ ID n° 2 ou SEQ ID n°4 ou dérivée, méthode elle-même comprise dans la présente invention, et caractérisée en ce que l'on cultive les cellules transfectées dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide recombinant de séquence SEQ ID n° 2 ou SEQ ID n°4, ou dérivée, et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant.

Les procédés de purification utilisés sont connus de l'homme du métier. Le polypeptide recombinant peut être purifié à partir de lysats et extraits cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps mono ou polyclonaux spécifiques.

Les anticorps mono- ou polyclonaux capables de reconnaître spécifiquement l'IL-13R β ou/et l'IL-13R α selon la définition donnée précédemment font également partie de l'invention. Des anticorps polyclonaux peuvent être obtenus à partir du sérum d'un animal immunisé contre l'IL-13R β ou/et l'IL-13R α selon les modes opératoires usuels.

Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus selon la méthode classique de culture d'hybridomes décrite par Köhler et Milstein (Nature, 1975, 256, 495-497).

Des anticorps avantageux sont des anticorps dirigés contre le domaine extracellulaire de l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α .

Les anticorps selon l'invention sont par exemple des anticorps chimériques, des anticorps humanisés, des fragments Fab et F(ab')₂. Ils peuvent également se présenter sous forme d'immunoconjugués ou d'anticorps marqués. Par exemple, ils peuvent être associés à une toxine, telle la toxine diphtérique ou à un produit radioactif. Ces immunotoxines peuvent dans ce cas constituer des agents thérapeutiques utilisables pour le traitement de certaines pathologies impliquant une surexpression de l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α .

Les anticorps de l'invention, en particulier les anticorps monoclonaux peuvent également être utilisés pour l'analyse par immunocytochimie des récepteurs de l'IL-13 sur des coupes de tissus spécifiques, par exemple par immunofluorescence, par marquage à l'or, ou à la peroxydase.

- 5 Ils peuvent ainsi être avantageusement mis en oeuvre dans toute situation où l'expression de l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α doit être observée comme par exemple une surexpression anormale ou le suivi de la régulation de l'expression membranaire.

- 10 L'invention concerne donc également un procédé de diagnostic *IN VITRO* de pathologies corrélées à une expression anormale de l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α , à partir de prélèvements biologiques susceptibles de contenir l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α exprimé à un taux anormal, caractérisé en ce que l'on met en contact au moins un anticorps de l'invention avec ledit prélèvement biologique, dans des conditions permettant la formation éventuelle de complexes immunologiques
- 15 spécifiques entre l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α et le ou lesdits anticorps et en ce que l'on détecte les complexes immunologiques spécifiques éventuellement formés.

- L'invention concerne également un kit pour le diagnostic *IN VITRO* d'une expression anormale de l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α dans un prélèvement biologique ou/et pour la mesure du taux d'expression du récepteur de l'IL-13 dans
- 20 ledit prélèvement comprenant :

- au moins un anticorps spécifique de l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α , éventuellement fixé sur un support,
 - des moyens de révélation de la formation de complexes antigènes/anticorps spécifiques entre l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α et ledit anticorps et/ou des moyens
- 25 de quantification de ces complexes.

Un autre objet de l'invention concerne une méthode pour l'identification et/ou l'isolement de ligands spécifiques de l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α ou d'agents capables de moduler son activité, caractérisée en ce que l'on met en contact un

composé ou un mélange contenant différents composés, éventuellement non-identifiés, avec des cellules exprimant à leur surface l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α , dans des conditions permettant l'interaction entre le récepteur de l'IL-13 et ledit composé, dans le cas où celui-ci posséderait une affinité pour le récepteur, et en ce
5 que l'on détecte et/ou isole les composés liés à l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α , ou ceux capables d'en moduler l'activité biologique.

Dans un mode particulier, cette méthode de l'invention est adaptée à l'identification et/ou l'isolement d'agonistes et d'antagonistes de l'IL-13 pour son récepteur l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α .

10 L'invention comprend également des compositions pharmaceutiques comprenant comme principe actif un polypeptide répondant aux définitions précédentes, préférentiellement sous forme soluble, associé à un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Un tel polypeptide peut en effet agir en compétition avec l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α exprimé à la surface cellulaire, et constituer de ce fait un antagoniste
15 spécifique de la liaison de l'IL-13 à son récepteur, qui peut avantageusement être mis en oeuvre pour la synthèse d'un médicament destiné à moduler les réactions médiées par l'IL-13 dans des situations pathologiques.

L'invention comprend enfin une méthode de traitement thérapeutique d'affections
20 liées à des réactions immunologiques médiées par l'IL-13, comprenant l'administration à un patient de l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α (ou d'un de leurs fragments biologiquement actif), ou d'un composé capable d'en moduler spécifiquement l'activité biologique, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la
25 description avec les exemples et les figures dont les légendes sont représentées ci-après.

LEGENDE DES FIGURES

- Figure 1 : caractérisation du récepteur IL-13R β humain présent dans les cellules Caki-1.

- 5 a) analyse de Scatchard (cadre inséré) de la courbe de saturation de l'IL-13 marquée à l' $[^{125}\text{I}]$;
b) liaison de $[^{125}\text{I}][\text{Phe43}]\text{-IL-13-GlyTyrGlyTyr}$ en présence de concentration croissante d'IL-13 non marquée (\bullet) et d'IL-4 (\circ);
c) expériences de pontage ("cross-link") en utilisant de l'IL-13 radioactive en l'absence (coulée a) et en présence d'un excédent de 100 fois d'IL-13 non marquée (coulée b) ou d'IL-4 (coulée c) ;
10 d) inhibition de la sécrétion d'IL-6 induite par l'IL-13 et l'IL-4 en présence d'un anticorps monoclonal spécifique de la chaîne IL-4R et de l'antagoniste de IL-4, Y124DIL-4.

15

- Figure 2 : Séquence nucléotidique de l'ADNc de l'IL-13R β , et comparaison des séquences protéiques de l'IL-5R, l'IL-13R α murine et de l'IL-13R β .

- a) séquence nucléotidique de l'ADNc de l'IL-13R β . Les acides aminés correspondant au peptide signal déduit de la séquence nucléique sont indiqués en italiques et ceux correspondant au domaine transmembranaire sont indiqués en caractères gras. Les sites de N-glycosylation potentiels (Asn-X-Ser/Thr) sont soulignés ;
20 b) alignement des acides aminés des séquences de l'IL-13R β et de l'IL-5R. Les séquences protéiques de l'IL-13R et IL-5R sont alignées comme décrit précédemment (24). Les résidus cystéine et le motif WSXWS caractéristiques de
25 cette famille de récepteurs sont encadrés.

- Figure 3 : Profils d'expression de l'ARNm de l'IL-13R β .

L'ARN a été préparé à partir des cellules suivantes : Caki-1 (coulée a), A431 (coulée b), TF-1 (coulée c), U937 (coulée d), Jurkat (coulée e) et IM9 (coulée f).

- Figure 4 : Caractérisation du récepteur IL-13R β recombinant de l'IL-13.

- 5 Les cellules COS-7 sont transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R β et utilisées pour :
- a) des études de liaison de l'IL-13 radiomarquée (cadre inséré), par analyse de Scatchard de la courbe de saturation;
 - b) des expériences de pontage en utilisant de l'IL-13 radiomarquée en absence (coulée a) et en présence d'un excès de 100 fois d'IL-13 non marquée (coulée b) ;
 - 10 c-d) des expériences de cotransfection en utilisant l'IL-13R β cloné, l'IL-4R (gp140) et la chaîne γ suivies par la liaison de l'IL-13 radiomarquée (c) ou de l'IL-4 (d). Les colonnes noires et blanches représentent respectivement la liaison spécifique de l'IL-13 et de l'IL-4.

- 15 - Figure 5 : Inhibition de la liaison de l'IL-13 sur l'IL-13R β par la forme soluble du récepteur (IL-13R β s) en expression transitoire.

L'expression d'IL-13R β s dans le surnageant des cellules transfectées par 2034 est testée par inhibition de la liaison de l'IL-13 sur les cellules transfectées par l'IL-13R β (2036). Les surnageants sont testés bruts en les diluant de moitié dans le

20 ligand iodé.

2036 NSB : liaison non spécifique en présence d'un excès d'IL-13 non marquée

2036 BT : liaison totale sur cellules transfectées avec le 2036

2036 + sgt 2034 : liaison sur cellules transfectées avec le 2036 en présence de surnageant de cellules transfectées avec le 2034.

- 25 2036 + sgt pSE1 : contrôle

- Figure 6 : Inhibition de la liaison de l'IL-13 sur l'IL-13R β par la forme soluble du récepteur (IL-13R β s) sur des lignées stables.

T2036-22 : liaison totale sur le clone IL-13R β (2036-22) sans présence de surnageant de clone sécrétant l'IL-13R β s (référence 100 %)

2034-4

2034-6

5 2034-19 _ 4 clones IL-13R β s

2034-21

1274-20 : en présence de surnageant de cellules CHO n'exprimant pas l'IL-13R β s (contrôle).

10 - Figure 7 : Séquence nucléotidique de l'ADNc de l'IL-13R α et comparaison des séquences protéiques de l'IL-13R α humain et de l'IL-13R α murin

15 a) Séquence nucléotidique de l'ADNc de l'IL-13R α . Les acides aminés correspondant au peptide signal déduit de la séquence nucléique sont soulignés par un trait pointillé et ceux correspondant au domaine transmembranaires sont soulignés par un double trait. Les sites de N-glycosylation potentiels (Asn-X-Ser/Thr) sont encadrés.

20 b) Alignement des acides aminés de l'IL-13R α humain et de l'IL-13R α murin. Les séquences protéiques de l'IL-13R α humain et de l'IL-13R α murin sont alignées comme décrit précédemment (24). Les résidus cystéines et le motif WSXWS caractéristiques de cette famille de récepteurs sont encadrés.

- Figure 8 : Caractérisation du récepteur IL-13R α recombinant de l'IL-13.

25 Les cellules CHO ou COS-3 transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R α ou/et de l'IL-4R et utilisées pour :

a) des études de liaison de l'IL-13 marquée à l'iode 125, par analyse de Scatchard de la courbe de saturation avec des cellules CHO transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R β (figure A), transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R β et l'ADNc de l'IL-

4R (figure B), transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R α (figure C) et transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R α et l'ADNc de l'IL-4R (figure D).

b) des expériences de compétitions de liaisons de l' [125 I]-IL-13 sur des cellules CHO transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R β (figure E), transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R β et l'ADNc de l'IL-4R (figure F), transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R α (figure G) et transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R α et l'ADNc de l'IL-4R (figure H). Les colonnes blanches et hachurées représentent respectivement la liaison spécifique de l'IL-13 radiomarquée en présence d'un excès (1000 fois plus) d'IL-13 ou d'IL-4, les colonnes noires représentent la liaison totale.

10

- Figure 9 : comparaison de la mobilité électrophorétique dans l'EMSA d'extraits cellulaires exprimant le récepteur de l'IL-4 seul (CHO-4), le récepteur de l'IL-13R α seul (CHO-13) ou les récepteurs combinés IL-13R α et IL-4R (CHO-4-13) après activation des cellules CHO en présence d'IL-4 ou d'IL-13 (4 ou 13), c

15

représentant le témoin non activé..

MATERIELS ET METHODES

Expériences de liaison et de pontage :

Les expériences de liaison et de pontage sont réalisées comme décrit pour
5 $[^{125}\text{I}][\text{Phe43}]\text{-IL-13-GlyTyrGlyTyr}$ (17).

Induction de la sécrétion d'IL-6 :

Les cellules Caki-1 (ATCC HTB46) sont mises dans des plaques de 24 puits à une
densité de $5 \cdot 10^4$ cellules/puits et après 3 jours de culture des monocouches
10 confluentes sont lavées trois fois avec du milieu DMEM sans sérum de veau foetal.
La stimulation des cellules Caki-1 est réalisée avec 30 ng/ml d'IL-4 ou d'IL-13 en
absence ou en présence de Y124DIL-4 ou d'un anticorps monoclonal anti-gp140.
La quantité d'IL-6 libérée dans le milieu de culture après 24 heures d'incubation est
mesurée par une technique ELISA (Innotest, France).

15

Isolement et analyse de l'ADNc de l'IL-13R β humain :

L'ARN total a été extrait des cellules Caki-1 comme décrit précédemment (25).
L'ARN poly(A) est isolé des ARN totaux avec des billes magnétiques recouvertes
d'oligo(dT)₂₅ (Dynal). Une banque d'ADNc contenant $2 \cdot 10^5$ clones a été construite
20 en utilisant la procédure d'amorces adaptateurs (26) et le vecteur pSE-1 (27). La
stratégie de clonage pour l'expression qui a été utilisée a été décrite précédemment
(17).

Obtention de l'ADNc de l'IL-13R β humain :

25 Les échantillons d'ARN sont copiés avec la reverse transcriptase et soumis à une
PCR (réaction de polymérisation en chaîne) en utilisant une amorce sens
correspondant à la séquence + 489 à + 490 et une amorce antisens correspondant
à + 52 à + 71 (la numération est faite sur la base de la séquence de l'ADNc
montrée sur la figure 2). Les produits amplifiés par PCR sont hybridés avec une

sonde complémentaire des séquences + 445 à + 461 de l'ADNc. Les marqueurs de taille sont indiqués à la gauche de la figure.

Isolement et analyse de l'ADNc de l'IL-13 R α humain :

5

1) Préparation de la sonde IL-13 R α murin

a) Culture des cellules B9 (28)

Les cellules B9 sont cultivées en milieu RPMI (Gibco) supplémenté de 10% de
10 sérum de veau foetal et 50 μ g / ml de gentamycine.

b) Préparation de l' ARN des cellules B9.

Les cellules sont lavées deux fois avec du tampon PBS (phosphate buffer saline,
référence 04104040-GIBCO-BRL). Après centrifugation 10 minutes à 1000 rpm,
15 le culot cellulaire est mis en suspension dans le tampon de lyse de composition
suivante : guanidine-thiocyanate 4M ; citrate de sodium 25 mM pH 7 ; sarcosyl
0.5% ; β 2-mercaptoéthanol 0.1 M.

La suspension est soniquée à l'aide d'un sonicateur ultra turax no 231256 (JANKE
et KUNDEL) à puissance maximale pendant une minute. On ajoute de l'acétate de
20 sodium pH 4 jusqu'à 0.2 M. La solution est extraite avec un volume d'un mélange
de phénol / chloroforme (v / v ; 5 / 1).

On précipite à - 20°C l'ARN contenu dans la phase aqueuse à l'aide d'un volume
d'isopropanol. Le culot est resuspendu dans le tampon de lyse. La solution est à
nouveau extraite avec un mélange phénol / chloroforme et l'ARN est précipité avec
25 de l'isopropanol. Après lavage du culot avec de l'éthanol 70% puis 100%, l'ARN
est resuspendu dans de l'eau.

c) Préparation de l'ADN complémentaire.

L'ADNc est préparé à partir de 5 µg d'ARN total en utilisant une amorce poly T12. On incube l'ARN total dans un volume de 30 µl de tampon : Tris HCl 50 mM pH 8.3, MgCl₂ 6 mM, DTT 10 mM, KCl 40 mM, contenant 0.5 mM de chacun des désoxynucléotides triphosphates et 30 unités de Rnasin (Promega), une heure à 37 °C, puis 10 minutes à 50 °C, puis de nouveau 10 minutes à 37 °C, avec 200 unités de l'enzyme transcriptase inverse Rnase H- (Gibco-BRL référence 8064A). La réaction est interrompue en chauffant 10 minutes à 65 °C.

d) Amplification spécifique d'un fragment de l'ADNc du IL13R α de souris par la technique de PCR.

La polymérisation est réalisée avec 6 µl d'ADNc dans 50 µl final avec le tampon de composition suivante : Tris HCl 10mM pH 8.3, MgCl₂ 2.5 mM, KCl 50 mM, 4 dNTP 0.2 mM, 2 µg / ml de chacune des deux amorces nucléiques et de 2.5 u de TAQ ADN polymérase (Beckman). Les couples d'amorces ont été choisis sur la séquence publiée par Hilton (22).

Amorce sens : nucléotide 249 à 268

5' AGAGGAATTACCCCTGGATG 3'

Amorce anti-sens : nucléotide 1256 à 1275

5' TCAAGGAGCTGCTTTCTTCA 3'

La réaction est réalisée durant 30 cycles 1 minute à 94°C, 1 minute à 58°C, 4 minutes à 72°C, suivi d'un dernier cycle de 10 minutes à 72°C.

e) Purification du produit d'amplification PCR.

Après migration sur un gel d'agarose 1% (Sigma) en tampon TAE (Tris HCl 40 mM, EDTA 1mM pH7.9) pendant 1 heure à 100 volts, le gel est coloré en présence de bromure d'ethidium à 1µg / ml dans le même tampon. La bande

correspondant au produit d'amplification (fragment d'ADNc de 1027 paires de bases (pB) de l'IL13R α) est extraite en utilisant un kit Glass Max (Gibco).

5 f) Préparation de la sonde.

25 ng du fragment de 1027 paires de bases (pB) d'ADNc purifié correspondant au récepteur IL-13R α de souris sont marqués au phosphore 32 avec le kit BRL "Random Primers DNA labelling systems" à une activité spécifique de 2.4×10^9 dpm / μ g ; alternativement, 100 ng sont marqués par Nick-translation en utilisant
10 le kit Boehringer à une activité spécifique de 4×10^8 dpm / μ g.

2) Isolement et analyse de l'ADNc de l'IL-13R α humain

a) Préparation de l'ARN total

L'ARN total a été extrait des cellules Caki1 comme décrit précédemment dans le
15 paragraphe 1b.

b) Purification de l'ARN messager (fraction polyA⁺).

La purification de la fraction polyA⁺ de l'ARN est réalisée à l'aide du kit Dynabeads oligo (dT) 25 de DYNAL (référence 610.05) suivant le protocole
20 préconisé par le fabricant. Le principe est basé sur l'utilisation de billes polystyrène super-paramagnétique sur lesquelles est attaché un oligonucléotide poly (dT) 25. La fraction polyA⁺ est hybridée sur l'oligonucléotide (dT) 25 couplé aux billes que l'on piège sur un support magnétique.

25 c) Northern blot.

5 μ g d'ARN messager poly A⁺ sont déposés sur gel dénaturant 8% formaldéhyde, 1% agarose en tampon MOPS (10mM pH 7.4, EDTA 0.5 mM). Après migration et transfert sur membrane hybond N⁺ (Amersham) en tampon 20 X SSC, l'ARN est fixé en chauffant au four à 80°C sous vide. La membrane est alors préhybridée

2 heures à 42°C dans le tampon suivant : 1 M NaCl ; 30% formamide ; 1% SDS ;
5 X Denhart's ; 100 µg / ml d' ADN de sperme de saumon. Après 2 heures de
préhybridation, la membrane est hybridée dans le même tampon avec une
concentration de sonde IL-13Rα de souris préparée par "random priming" de 2.5
5 10⁶ dpm / ml, pendant 16 heures. La membrane est ensuite lavée 2 fois pendant 30
minutes dans le tampon 2 x SSC 0.1% SDS à température ambiante puis pendant 2
heures à 50°C dans le même tampon. Après 4 jours d' exposition dans une cassette
(Molecular Dynamics), le northern blot est analysé à " l'Instant Imager "
(Molecular Dynamics). Un transcrit majoritaire de 4200 paires de bases (pB)
10 et un doublet de 1500 pB et 2000 pB sont détectés dans les cellules Caki1, U373
et U937.

Caractérisation des propriétés de l'IL-13Rβ et de l'IL-13Rα humain :

Les cellules COS-7 ou CHO sont transfectées dans des boîtes de Pétri comme
15 décrit précédemment (17). 24 heures plus tard, les cellules sont trypsinisées et
mises en culture dans des plaques de 24 puits à une densité de 8.10⁴ cellules/puits.
Après une culture de 48 heures à 37°C, les cellules sont utilisées pour des
expériences de liaison (des essais réalisés en triplicata montrent une variation de
moins de 10 %) avec de l'IL-13 iodée comme décrit (17). Pour la transfection, les
20 cellules COS-7 ou CHO ont été transfectées dans des plaques de 25 cm² en
utilisant 0,6 mg de différents plasmides. Après 24 heures, les monocouches cellu-
laires sont trypsinisées et mises en culture dans des plaques à 12 puits à raison de
8.10⁴ cellules/puits. Trois jours plus tard, les expériences de liaison et de
compétition sont réalisées avec de l'IL-13 marquée et avec de l'IL-13 et/ou de
25 l'IL-4 non marquées. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences
réalisées indépendamment.

Comparaison des mobilités électrophorétiques dans l' "EMSA" des extraits
nucléiques de cellules exprimant l'IL-13Rα et/ou l'IL-4R humains :

2.10⁶ cellules CHO sont réparties dans des boîtes de Pétri de diamètre 10 cm. 24 heures plus tard, les cellules sont transfectées avec 6 µg d'ADN plasmide (34). Après 48 heures, les cellules sont incubées à 37°C pendant 30 minutes dans 3 ml de milieu avec ou sans IL-13 ou IL-4 à une concentration de 100 ng par ml. Les
5 cellules sont ensuite rincées deux fois avec un tampon PB5-0,5 mM d'EDTA puis resuspendues dans 1,2 ml de PB5. Les cellules sont ensuite centrifugées et les extraits cellulaires préparés comme décrit dans (35). Les EMSA sont ensuite réalisées comme décrit dans (36) avec de 10 à 20 µg d'extraits cellulaires et avec
10 une sonde oligonucléotidique radiomarquée au ³²P (50000-100000 cpm), sonde correspondant à l'élément Cε du promoteur Cε humain (37). La sonde oligonucléotidique synthétisée présente la séquence suivante :
5'-GATCCACTTCCCAAGAACAGA-3'.

EXEMPLES

EXEMPLE 1 :

Analyse de l'expression de l' IL-13R β humain à la surface des cellules Caki-1

- 5 Il a récemment été découvert que des cellules de carcinome rénal humain exprimaient en plus des récepteurs communs à l'IL-4 et à l'IL-13, un large excès de récepteurs spécifiques de l'IL-13 (21). Sur la base de ces résultats, un échantillon de lignées cellulaires de carcinome humain a été étudié pour la fixation de l'IL-13 comme décrit précédemment (17). Une lignée particulière, Caki-1 (ATCC
- 10 HTB46), qui exprime un nombre particulièrement important de sites de liaisons pour l'IL-13, a été analysée plus en détail. Les courbes de Scatchard obtenues à partir d'expériences de saturation montrent la présence de sites de liaison avec une Kd de 446 ± 50 pM et une capacité de $7,2 \cdot 10^4$ récepteurs/cellule (figure 1a). Dans des expériences de compétition, l'IL-13 non marquée déplace totalement l'IL-13
- 15 marquée d'une façon dose dépendante, alors que l'IL-4 déplace avec une haute affinité environ 10 % de l'IL-13 marquée. Des concentrations plus importantes d'IL-4 (supérieures à 100 nM) ne déplacent pas les 90 % restants d'IL-13 liée (figure 1b).
- 20 Ces résultats sont en concordance avec l'existence de deux sites l'un partagé par les deux cytokines, l'autre spécifique de l'IL-13. Les expériences de pontage par affinité de l'IL-13 montrent un complexe d'environ 70 kDa, qui coïncide avec le complexe observé dans des expériences de pontage similaire avec l'IL-13 dans différents types cellulaires (17,21). L'IL-13 marquée est complètement déplacée du
- 25 complexe par l'IL-13 mais pas par l'IL-4, ce qui est accord avec les expériences de compétition (figure 1c).

EXEMPLE 2 :

Analyse de la sécrétion d'IL-6 induite par l'IL-4 ou l'IL-13.

- Les auteurs de l'invention ont analysé la sécrétion induite par l'IL-4 ou l'IL-13 sur des cellules Caki-1. Les deux cytokines induisent la sécrétion de niveaux similaires d'IL-6, et la sécrétion est inhibée par des anticorps spécifiques de la chaîne α de l'IL-4R et par l'antagoniste Y124DIL-4 (figure 1d). Ceci suggère que les récepteurs partagés par les deux cytokines dans les cellules Caki-1 sont responsables de l'induction de la sécrétion d'IL-6. Des résultats similaires sont observés quand la phosphorylation du complexe protéique IRS1/4PS (18) induite par l'IL-4 et l'IL-13 est analysée en présence ou en absence d'anticorps anti-IL-4R et d'antagoniste de l'IL-4.
- Ces résultats pris dans leur ensemble suggèrent que le complexe récepteur IL-4/IL-13 exprimé dans les cellules Caki est identique à ce qui avait été précédemment décrit et que la protéine liant l'IL-13 (IL-13R β) qui est surexprimée, est un composant du récepteur responsable de la reconnaissance de l'IL-13 dans un complexe fonctionnel qui inclut IL-4R.
- Ces cellules ont donc été utilisées comme source d'ARN messager pour le clonage de cette entité liant l'IL-13.

EXEMPLE 3 :

Clonage de la sous unité primaire du récepteur de l'IL-13 (IL-13R β)

- La stratégie de clonage et d'expression qui a été utilisée a été précédemment décrite (17). Une banque d'ADNc contenant 2.10^5 clones recombinants a été construite (26) à partir des cellules Caki-1. La banque a été divisée en lots de 1000 ADNc, dont l'ADN de chaque lot sous forme de plasmide a été introduit dans des cellules COS-7 (29). La liaison d'IL-13 marquée aux cellules COS-7 transfectées permet d'identifier les lots de clones codant un récepteur de l'IL-13. Les lots positifs ont été répartis et recriblés jusqu'à l'identification d'un clone unique capable de réaliser la synthèse d'une protéine de surface cellulaire apte à lier l'IL-13. Deux ADNc de l'IL-13R β indépendants ont été finalement isolés. La séquence nucléotidique complète de l'ADNc de l'IL-13R β et la séquence d'acides

aminés qui en est déduite sont montrées sur la figure 2a. L'ADNc a une longueur de 1298 bases en excluant la queue poly-A et a une courte région non traduite en 3' de 106 bases. Un signal canonique de polyadenylation AATAAA se trouve à la place prévue. Le cadre de lecture ouvert entre les nucléotides 53 et 1192 définit un polypeptide de 380 acides aminés. La séquence code pour une protéine membranaire avec un peptide signal potentiel, un seul domaine transmembranaire et une courte queue intracytoplasmique.

4 sites de N-glycosylation potentiels sont localisés dans la région extracellulaire. Il est important de noter que deux motifs consensus considérés comme des signatures de la famille des récepteurs de cytokine de type II (30) sont aussi présents, le premier étant dérivé d'une structure en boucle de pont disulfure N-terminal, le second étant le motif de type WSXWS localisé à l'extrémité C-terminale de la région extra cellulaire. La très courte séquence cytoplasmique pourrait expliquer pourquoi c'est seulement le complexe récepteur partagé par l'IL-4 et par l'IL-13 dans les cellules Caki qui transduit un signal dans la cellule.

Des études d'alignement démontrent des homologues avec la chaîne α de l'IL-5R humain (51 % de similarité et 27 % d'identité, figure 2b) et à un degré moindre, avec le récepteur de la prolactine. Il est intéressant de noter que le complexe IL-5R est constitué d'une chaîne α qui lie l'IL-5 mais qui a besoin d'une autre protéine, la chaîne β partagée avec les récepteurs de l'IL-3 et du GM-CSF, pour former un récepteur de haute affinité qui est capable de transduire un signal (31).

EXEMPLE 4 :

Détection des ARN messagers de l'IL-13R β humain dans différentes lignées cellulaires

De façon surprenante, dans les cellules Caki-1 des quantités similaires d'ARN messagers de l'IL-13R β et IL-4R sont détectées par des analyses de northern blot bien qu'un large excès d'IL-13R β soit exprimé. Cette observation suggère qu'il y a une plus forte traduction de cet ARNm par rapport au transcript de l'IL-4R et

explique l'absence de détection de l'ARNm de l'IL-13R β dans les lignées cellulaires exprimant un faible nombre de sites de liaison de l'IL-13. Des analyses par RT-PCR (figure 3) montrent que le transcript trouvé dans les cellules Caki-1 est aussi présent à des degrés inférieurs dans la lignée kératinocytaire A431, les cellules 5 prémyéloïdes TF-1, les cellules prémyocytiques U937, et la lignée cellulaire B IM9. Aucun transcript n'est détecté dans la lignée cellulaire T Jurkat ni dans la lignée cellulaire pré-B NALM6. Ces résultats sont en accord avec des études de liaison de l'IL-13 sur ces mêmes lignées précédemment décrites par les auteurs de la présente invention (17), et avec les cibles biologiques connues de l'IL-13.

10

EXEMPLE 5 :**Analyses de liaison réalisées sur des cellules COS-7 transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R β humain**

Les cellules COS-7 transfectées avec l'ADNc isolé codant pour l'IL-13R β lient 15 spécifiquement l'IL-13 marquée. L'analyse de Scatchard de la courbe de saturation montre un seul site composant avec une K_d d'une valeur de 250 \pm 30 pM et une capacité de liaison maximale de 5,6.10⁵ récepteurs/cellule (figure 4a).

L'affinité du récepteur recombinant est en bon accord avec la valeur de K_d de 446 pM pour l'IL-13R β dans les cellules Caki-1 et pour ce qui a été décrit dans plusieurs autres cellules (17). Donc, malgré l'homologie de séquence avec la chaîne α 20 de l'IL-5R, le récepteur cloné se comporte différemment puisqu'il n'a pas besoin d'une seconde chaîne pour reconstituer un site de liaison de haute affinité.

Il est intéressant de noter que la protéine liant l'IL-15 récemment décrite possède de la même façon la caractéristique de lier avec une forte affinité l'IL-15, en 25 l'absence des deux autres composants du complexe IL-15R (32).

Dans des expériences de compétition, l'IL-13 est capable d'inhiber la liaison de l'IL-13 marquée au récepteur cloné, avec une constante d'inhibition (K_i) de 1,5 \pm 0,5 nM, alors que l'IL-4 n'inhibe pas la liaison. La pharmacologie du récepteur cloné est donc similaire à celle de l'IL-13R β présent dans les cellules Caki-1. Des

expériences de pontage montrent une bande radiomarquée de 70 kDa. Cette bande a la même mobilité que celle observée dans les cellules Caki ainsi que dans d'autres cellules (17). Ce complexe correspond très probablement à la bande de 60-70 kDa observée en plus de la bande de 140 kDa de l'IL-4R dans les expériences de pontage réalisées avec l'IL-4 marquée. Ceci pourrait aussi suggérer qu'il existe une forte interaction entre les deux protéines dans le complexe récepteur fonctionnel. Les auteurs de la présente invention ont donc vérifié si l'IL-13R β et l'IL-4R interagissent dans la membrane cellulaire pour reconstituer un récepteur qui permet une compétition croisée des deux cytokines. Les résultats d'expérience de coexpression sont montrés dans la figure 4,c et d.

Il apparait clairement que l'expression des deux récepteurs soit isolée soit simultanée, résulte en un grand nombre de récepteurs qui reconnaissent spécifiquement l'une ou l'autre des deux cytokines. Toutefois, lorsqu'ils sont exprimés ensemble, un petit nombre de récepteurs (5 à 10 %) est capable de reconnaître les deux cytokines. La cotransfection de la chaîne γc avec l'IL-4R et l'IL-13R β ne procure pas une augmentation dans le nombre de sites de liaison partagés. Ces résultats suggèrent que les chaînes de l'IL-13R β et IL-4R peuvent interagir l'une avec l'autre dans la membrane cellulaire pour reconstituer un récepteur pour lequel l'IL-13 et l'IL-4 peuvent être en compétition. Le faible pourcentage de récepteurs reconstitués est un argument en faveur de la présence d'une autre protéine (IL-13R α) en quantités limitantes dans les cellules COS, nécessaire pour la reconstitution du complexe récepteur auquel se lient en compétitivité l'IL-13 et l'IL-4.

Les résultats obtenus dans les expériences de transfection avec la chaîne γc démontrent que cette protéine n'est pas le facteur limitant qui avait été suggéré auparavant (15). Cette conclusion est aussi supportée par l'absence d'ARN messager de γc dans les cellules Caki-1 (21).

Une autre raison possible pour expliquer le faible nombre de récepteurs reconstitués est l'existence d'une stoechiométrie incorrecte des deux protéines dans

la membrane cellulaire. Toutefois, des cotransfections utilisant des quantités relatives différentes d'IL-4R et d'IL-13R β ne montrent pas de différence majeure dans le nombre de récepteurs reconstitués. La possibilité qu'il existe un autre IL-13R avec une plus forte capacité à interagir avec IL-4R, a été confirmée chez la

5 souris (22) et chez l'homme par l'isolement de l'ADNc de l'IL-13R α (cf. EXEMPLE 7). Il doit être noté que l'expression de γc améliore la liaison de l'IL-4 comme cela a été précédemment décrit (19) mais diminue la liaison de l'IL-13, suggérant une interaction complexe entre les différentes chaînes.

EXEMPLE 6 :

Etude de l'inhibition de la liaison de l'IL-13 à son récepteur membranaire par un récepteur sous forme soluble.

On décrit les résultats en expression transitoire (figure 5) ou sur les lignées stables

5 (figure 6).

Les deux séquences d'ADNc, codant pour l'IL-13R β et pour l'IL-13R β s sont insérées dans le vecteur p7055 à la place de l'ADNc de l'IL-2 (33). Les plasmides résultants sont nommés 2036 et 2034 respectivement.

10 a) Expression transitoire

Les cellules CHO sont ensemencées en plaques 12 puits à $3 \cdot 10^5$ cellules/puits et transfectées le lendemain par la méthode DEAE-Dextran comme pour les cellules COS, soit avec le plasmide 2036 ou 2034, soit avec le plasmide pSE-1 vide comme témoin.

15 Les cellules sont cultivées pendant trois jours de façon à permettre une accumulation de l'IL-13R β s dans le surnageant des cellules transfectées avec le plasmide 2034 et une bonne expression de l'IL-13R β dans la membrane des cellules transfectées avec le plasmide 2036.

Le surnageant des cellules transfectées avec l'IL-13R β s (2034) ou le témoin négatif (pSE-1 vide) est alors prélevé et les cellules transfectées avec l'IL-13R α sont utilisées pour l'étude de l'inhibition de la liaison de l'IL-13.

20 La liaison de l'IL-13 à la surface des CHO exprimant l'IL-13R β (2036) est mesurée en présence ou non de ces surnageants bruts dilués de moitié avec le radioligand ou en présence d'un excès d'IL-13 non radiomarquée (NSB). La liaison s'effectue
25 sur les cellules entières dans un volume final de 500 μ l avec 300 pM de radioligand, en triplicata.

b) Lignées stables

Deux lignées stables de CHO transformées sont obtenues par transfection avec les séquences codantes de l'IL-13R β complet (polypeptide de 380 résidus) ou de l'IL-13R β sous forme soluble (IL-13R β s, polypeptide tronqué, correspondant aux résidus 1 à 337 de l'IL-13R β). Ces séquences sont insérées dans le vecteur p 7055. Les cellules CHO-DHFR⁺ sont transfectées avec les plasmides 2036 (IL-13R β) et 2034 (IL-13R β s) et les clones recombinants sélectionnés comme décrit précédemment (33).

L'un des clones CHO-IL-13R β (CHO 2036) obtenus, présentant 2 à 5.10⁵ sites par cellule estensemencé en plaque 12 puits à une densité de 10⁵ cellules par puits et les cellules sont utilisées deux jours après pour des expériences de liaison en présence ou non d'IL-13R β s.

Pour cela, les clones CHO-IL-13R β s (CHO 2034) sontensemencés en boîtes de 6 cm, en triplicata à 5.10⁵ cellules par boîte. Après 3 jours d'accumulation dans le milieu de culture, le milieu (5 ml par boîte) est prélevé pour les études d'inhibition de liaison de l'IL-13 sur l'IL-13R β du clone CHO 2036. De la même façon, le surnageant de cellules CHO n'exprimant pas l'IL-13R β soluble est prélevé.

La liaison de l'IL-13 à la surface du clone CHO 2036-22 est mesurée en présence ou non de ces surnageants bruts dilués de moitié avec le radioligand, ou en présence d'un excès d'IL-13 non radiomarquée (NSB). La liaison s'effectue en triplicata, sur les cellules entières, dans un volume de 500 μ l avec 300 pM de radioligand.

Les histogrammes des figures 5 et 6 représentent l'inhibition de la liaison de l'IL-13 sur l'IL-13R β par l'IL-13R β s. Une inhibition de la liaison de l'IL-13 à son récepteur peut s'observer sur plusieurs clones.

EXEMPLE 7**Clonage du récepteur IL13R α humain.**

a) Préparation de la banque d'ADNc à partir des ARN messagers polyA⁺ de cellules Caki1.

A partir de 0.5 µg d'ARN messenger polyA⁺, on prépare l'ADN complémentaire simple brin marqué au ³²P. dCTP (L'ADN complémentaire obtenu présente une activité spécifique de 3000 dpm/ng) avec l'amorce synthétique de séquence

5' < GATCCGGGCCCTTTTTTTTTT <3'

dans un volume de 30 µl de tampon suivant :

Tris Hcl 50mM pH 8.3 , Mgcl₂ 6mM , DTT 10 mM , Kcl 40 mM , contenant 0.5 mM de chacun des désoxynucléiques triphosphates , 30 µCi de dCTP α³² P et 30 U de Rnasin (Proméga). Après une heure d'incubation à 37°C, puis 10 minutes à 50°C, puis de nouveau 10 minutes à 37°C, avec 200 unités de l'enzyme transcriptase inverse Rnase H- (Gibco -BRL), on ajoute 4 µl d'EDTA. La matrice ARN est ensuite dégradée en ajoutant 6 µl d'une solution de NaOH 2,

l'incubation durant 5 minutes à 65°C.

Afin d'éliminer l'amorce synthétique, on purifie l'ADN complémentaire sur une colonne de 1 ml de séphacryl S400 (Pharmacia), équilibrée dans du tampon TE.

Les deux premières fractions radioactives sont regroupées et précipitées avec 1/10 de volume d'une solution d'acétate d'ammonium 10M et 2.5 volumes d'éthanol,

ceci après une extraction au chloroforme. On allonge ensuite l'ADNc en 5' en ajoutant une "queue" homopolymérique de dG avec 20 unités de l'enzyme terminale transférase (Pharmacia 27073001). Puis, on incube dans 20 µl de tampon de composition suivante : Tris HCl 30 mM pH 7.6 ; chlorure de cobalt 1

mM ; acide cacodylique 140 mM ; DTT 0.1 mM ; dGTP 1mM, pendant 15 minutes à 37°C, puis on ajoute 2 µl d'EDTA 0.5 M. On retraite de nouveau à la soude sans chauffer , on repurifie sur colonne S400 , on extrait au chloroforme et

on précipite à l'éthanol. Le culot est dissous dans 33 µl de tampon TE. L'étape suivante consiste à apparier le vecteur de clonage pT7T3-18 auquel on a préalablement ajouté une queue homopolymérique de dC après coupure par PstI,

l'ADNc et l' adaptateur. On met en présence l'ADNc (33 µl) avec 75 ng de vecteur pT7/T3-18 (5µl), 120 ng de l' adapteur (1µ l) de séquence suivante (comprenant un site Apa1),

5' AAAAAAAAAAAAAAGGGCCCG 3'

- 5 10 µl d' une solution de NaCl 200 mM, et on incube pendant 5 minutes à 65°C puis on laisse refroidir le mélange réactionnel jusqu'à température ambiante. L' étape suivante consiste à ligaturer le vecteur de clonage et l'ADNc simple brin dans un volume réactionnel de 100 µl avec 32.5 unités de l' enzyme ADN ligase du phage T4 (Pharmacia) pendant une nuit à 15°C dans un tampon de composition :
 - 10 Tris HCl 50 mM pH 7.5 ; MgCl₂ 10 mM , ATP 1mM. Les protéines sont ensuite éliminées par extraction au phénol suivie d'une extraction au chloroforme, puis on ajoute 1/10 de volume d'une solution d' acétate d' ammonium 10 mM et 2.5 volumes d' éthanol. On centrifuge, le culot est repris dans le tampon de composition Tris acétate 33 mM pH 7.9, acétate de potassium 62.5mM, acétate
 - 15 de magnésium 1 mM et DTT 1mM ; le deuxième brin d' ADNc est synthétisé dans un volume de 30 µl avec 30 unités de l'enzyme ADN polymérase du phage T4 (Pharmacia) et un mélange de 1 mM des quatre désoxynucléotides triphosphates ainsi que deux unités de la protéine du gène 32 du phage T4 (Pharmacia) pendant une heure à 37°C. On extrait au phénol et on en élimine les traces en déposant sur
 - 20 une colonne P10 (Biogel P10-200-400 mesh - référence 15011050 - Biorad). La dernière étape consiste à transformer des cellules *E . Coli* MC 1061 par électroporation de l'ADN recombinant à l' aide d' un appareil Biorad Gene Pulser utilisé à 2.5 kV dans les conditions prescrites par le fabricant, puis on cultive les bactéries pendant une heure dans du milieu LB de composition :
 - 25 bactotryptone 10 g / l; extrait de levure 5 g / l; NaCl 10 g / l.
- On détermine le nombre de clones indépendants obtenus en étalant une dilution au 1/1000 ème de la transformation après une heure d' incubation sur une boîte de milieu LB additionné de 1.5 % d' agar (p/v) et de 100 µg / ml d' ampicilline' appelé par la suite milieu LB gélisé.

Le nombre de clones indépendants obtenus est de 1 million.

b) Criblage de la banque d' ADNc.

La totalité de la banque est étalée sur du milieu gélosé (boîtes de Pétri de diamètre de 150 mm) revêtu de membranes Biodyne A (PALL référence BNNG 132).
5 Après une nuit à 37°C, les clones sont transférés par contact sur de nouvelles membranes. Ces dernières sont traitées en les déposant sur du papier Wathman 3 MM imbibé des solutions suivantes : NaOH 0.5 N, NaCl 1.5 M pendant 5 minutes puis Tris HCl 0.5 M pH 8, NaCl 1.5 M pendant 5 minutes. Après un traitement à
10 la protéinase K dans le tampon suivant : Tris HCl 10mM pH8, EDTA 10mM, NaCl 50mM, SDS 0.1%, protéinase K 100µg/ml pendant 30 minutes à 37°C, les membranes sont lavées abondamment dans du tampon 2 X SSC (sodium citrate NaCl), puis séchées au four sous vide à 80°C pendant 20 minutes.

15 c) Préhybridation et hybridation des membranes.

Les membranes sont alors préhybridées 2 heures à 42°C dans le tampon suivant : 1 M NaCl ; 30% formamide ; 1% SDS ; 5 X Denhart's ; 100 µg/ml d' ADN de sperme de saumon. Après les 2 heures de préhybridation, les membranes sont hybridées dans le même tampon avec une concentration de sonde IL-13Rα de
20 souris préparée par " nick-translation" de $2.5 \cdot 10^6$ dpm/ml, pendant 16 heures ensuite. Les membranes sont lavées 2 fois 30 minutes dans le tampon 2 x SSC 0.1% SDS à température ambiante puis 2 heures à 50°C dans le même tampon. Après une nuit d' exposition à - 80°C en présence d' un film Kodak X-OMAT, plusieurs clones positifs sont révélés.

25

d) Séquençage d' un clone IL-13Rα humain et analyse de la séquence.

La séquence est obtenue à l' aide du kit Applied Biosystem (référence 401628). La séquence nucléique complète de l' ADNc de l' IL13Rα et la séquence d' acides aminés qui en est déduite sont montrées sur la figure 7. L' ADNc a une longueur

de 3999 bases en excluant la queue de poly-A et possède une longue région 3' non traduite de 2145 bases.

Un signal canonique de polyadénylation se trouve à la place prévue. Le cadre de lecture ouvert entre les nucléotide 34 et 1851 définit un polypeptide de 427 acides aminés. La séquence code pour une protéine membranaire avec un peptide signal
5 potentiel, et un seul domaine transmembranaire et une courte région intracytoplasmique.

10 sites de glycosilation potentiels sont localisés dans la région extracellulaire. Il est important de noter que deux motifs consensus considérés comme des signatures de la famille des récepteurs de cytokines de type II sont aussi présents,
10 le premier étant dérivé d'une structure en boucle de pont disulfure N- terminal, le second étant le motif de type WSXWS localisé à l'extrémité C-terminale de région extracellulaire.

EXEMPLE 8

Analyses de liaison réalisées sur des cellules COS-3 ou CHO transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R α humain.

Les cellules CHO transfectées avec l'ADNc isolé codant pour l'IL-13R α lient
5 spécifiquement l'IL-13 marquée.

L'analyse de Scatchard de la courbe de saturation montre un seul site composant avec une Kd d'une valeur de $4,5 \pm 0,4$ nM et une capacité de liaison maximale de 26000 récepteurs/cellule (fig. 8C et 8G).

10 Les résultats des expériences de co-expression sont montrés dans les figures 8D et 8H.

L'analyse des résultats de la figure 8C met en évidence que l'IL-13R α s'exprime bien dans le clone 2036 des cellules CHO. On peut noter que l'IL-4R déplace 60 % de la liaison de l'IL-13 dans les cellules CHO cotransfectées avec l'ADNc de
15 l'IL-4R et de l'IL-13R α (figure 8H) mais en tenant compte d'un Kd de 7,5 nM pour l'IL-13R α on aurait 10 fois plus de sites IL-13R α que de sites IL-4R.

Les cellules CHO-hIL4R (IL-4R α humain) exprimant l'hIL-4R transfectées avec l'ADNc codant pour l'hIL-13R α lient spécifiquement l'IL-13 marquée.

L'analyse de Scatchard de la courbe de saturation montre clairement 2 sites
20 composants, l'un de haute affinité avec une Kd d'une valeur de $23 \pm 8,9$ pM et une capacité de liaison maximale de 28000 sites/cellule et, l'autre de basse affinité, avec une Kd d'une valeur de $4,2 \pm 1,4$ nM et une capacité de liaison maximale de 150000 sites/cellule (fig. 8D).

Le deuxième site caractérisé a la même affinité que l'hIL-13R α (IL-13R α humain)
25 exprimé seul et correspond aux chaînes IL-13R α non associées car exprimées en plus grande quantité que l'hIL-4R.

Ces récepteurs à haute affinité reconstitués en présence des 2 chaînes hIL-13R α et hIL-4R sont capables de reconnaître les 2 cytokines (fig. 8D et 8H).

Ceci est encore plus clair sur les cellules COS/pSE1 co-exprimant les 2 chaînes hIL-13R α et hIL-4R en quantité comparable où l'IL-4 déplace toute la liaison IL-13.

L'affinité de l'IL-13R α humain recombinant est comparable à celle décrite pour le récepteur IL-13R α de souris (2-10nM) (ref. 22).

Contrairement à la chaîne hIL-13R β , précédemment décrite, l'IL-13R α humain ne constitue pas seul un site de liaison de haute affinité.

L'IL-13R α et l'IL-4R interagissent donc dans la membrane cellulaire pour reconstituer un récepteur à haute affinité.

10

EXEMPLE 9

15 **Activation de protéines STAT par l'IL-13 et l'IL-4 dans les cellules CHO co-exprimant l'hIL-13R α et l'hIL-4R.**

Dans les cellules PBMC humaines, l'hIL-4 et l'IL-13 activent 2 tyrosine kinases de la famille des janus, Jak1 et Jak2 qui phosphorylent un facteur latent de transcription, STAT6. Ce facteur activé entre dans le noyau et se lie à des éléments spécifiques dans les promoteurs des gènes régulés par l'IL-4.

20 Nous avons choisi l'élément C ϵ du promoteur du C ϵ humain comme sonde dans un test de changement de mobilité électrophorétique (EMSA) pour démontrer l'activation par l'IL-13 d'un facteur de liaison similaire à STAT6.

Les extraits nucléaires des cellules CHO, exprimant l'IL-13R seul, l'IL-4R seul, ou les 2 chaînes ensemble, stimulées avec 100ng/ml d'IL-13 ou d'IL-4 pendant 30mn à

25 37°C, sont incubés avec l'élément C ϵ radiomarqué.

Les extraits nucléaires des cellules co-exprimant l'hIL-13R α et l'hIL-4R seul, forment un complexe ayant la même mobilité dans l'EMSA que les cellules soient induites avec l'IL-4 ou l'IL-13 (cf. figure 9). Par contre, avec les cellules exprimant l'une ou l'autre chaîne seule, aucun complexe n'est détecté.

Dans les cellules CHO exprimant l'hIL-13R α et l'hIL-4R, l'IL-13 et l'IL-4 initient donc la même cascade de signalisation.

- 5 Le clonage de l'IL-13R β et de l'IL-13R α décrit ici permet d'améliorer la connaissance des facteurs intervenant dans les réponses spécifiquement induites par l'IL-13 par rapport aux réponses induites par l'IL-4. Il permet en outre de disposer d'un outil pour l'étude de la régulation de l'expression du récepteur dans des conditions normales et pathologiques où l'IL-13 joue un rôle clé.
- 10 Par ailleurs, la disponibilité de l'ADNc permet de faciliter le clonage d'autres protéines nécessaires pour la reconstitution d'un complexe récepteur IL-4/IL-13 et est également utile pour la fabrication ou la modélisation rationnelle de nouveaux médicaments capables d'être des antagonistes spécifiques des activités de l'IL-13.

REFERENCES :

1. Minty, A. *et al.*, Nature, 1993, 362, 248-250.
2. McKenzie, A.N. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1993, 90,
5 3735-3739.
3. DeFrance, T. *et al.*, J Exp. Med., 1994, 179, 135-143.
4. Punnonen, J. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 1993, 90,
3730-3734.
5. Fior, R. *et al.*, Eur. Cytokine Network, 1994, 5, 593-600.
- 10 6. Muzio, M. R. F. *et al.*, Blood, 1994, 83, 1738-1743.
7. De Waal Malefyt, R. *et al.*, J. Immunol, 1993, 151, 6370-6381.
8. Doyle, A. *et al.*, Eur. J. Immunol., 1994, 24, 1441-1445.
9. Montaner, L.J. *et al.*, J. Exp. Med., 1993, 178, 743-747.
10. Sozzani, P. *et al.*, J. Biol. Chem., 1995, 270, 5084-5088.
- 15 11. Herbert, J.M. *et al.*, Febs Lett., 1993, 328, 268-270.
12. Derocq, J.M. *et al.*, Febs Lett. 1994, 343, 32-36.
13. Zurawski, G. *et al.*, Immunol. Today, 1994, 15, 19-26.
14. Interleukin-13 for Cytokines in Health and Disease. Eds D.G.
Remick and J.S. Frie, Marcel Decker, N.Y. 1996.
- 20 15. Zurawski S.M. *et al.*, Embo Journal, 1993, 12, 2663-2670.
16. Aversa, G. *et al.*, J. Exp. Med., 1993, 178, 2213-2218.
17. Vita, N. *et al.*, Biol. Chem., 1995, 270, 3512-3517.
18. Lefort, S. *et al.*, Febs Lett., 1995, 366, 122-126.
19. Kondo, M. *et al.*, Science, 1993, 262, 1874-1883.
- 25 20. Russell, S.M. *et al.*, Science, 1993, 262, 1880-1883.
21. Obiri, N. *et al.*, J. Biol. Chem., 1995, 270, 8797-8804.
22. Hilton, D.J. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 497-501.
23. Callard, R.E. *et al.*, Immunology Today, 1996, 17, 3, 108-110.
24. Devereux, J. *et al.*, Nucleic Acids Res., 1984, 12, 387-395.

25. Chomczynski, P. *et al.*, N. Anal. Biochem., 1987, 162, 156-159.
26. Caput, D. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83, 1670-1674.
27. Minty, a. *et al.*, Eur. Cytokine Network, 1993, 4, 99-110
28. Labit Le Bouteiller, C. *et al.*, J. of Immunol. Methods, 1995, 181, 1, 29-36.
- 5 29. Seed, B. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 3365-3369.
30. Bazan, J.F. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, 6934-6938.
31. Honjo, T. *et al.*, Current Opinion in Cell Biology, 1991, 1, 201-203.
32. Giri, J.G. *et al.*, Embo Journal, 1993, 14, 3654-3663.
33. Miloux, B. *et al.*, Gene, 1994, 149, 341-344.
- 10 34. Sampayrac, L. M. *et al.*, PNAS USA, 1981, 78, 7575-7578.
35. Jiang, S-W *et al.*, Nucleic Acid Res., 1995, 23, 3607-3608.
36. Köhler, I *et al.*, FEBS Letters, 1994, 345, 187-192.
37. Seidel, H.M. *et al.*, PNAS USA, 1995, 92, 3041-3045.

WO 97/20926

41

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: SANOFI
 (B) RUE: 32,34 rue MARBEUF
 (C) VILLE: PARIS
 (D) PROVINCE: FRANCE
 (F) CODE POSTAL: 75374
 (G) TELEPHONE: 0153774000
 (H) TELECOPIE: 0153774133

(ii) TITRE DE L' INVENTION: 11-13 recepteur

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 4

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 1539 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Homo sapiens
 (F) TYPE DE TISSUE: Carcinoma
 (G) TYPE DE CELLULE: renal
 (H) LIGNEE CELLULAIRE: caki-1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GGTGCCCTGTC GCGGGGAGA GAGGCAATAT CAAGTTTITA AATCTCGGAG AAATGGCTTA	60
ATTTCGTTTGC TTGGCTATCG GATGCTTATA TACCTTTCTG ATAAGCACAA CATTGGCTG	120
TACAAGCTTT TGCACCTTCAT CTTAGACAC CGAGATAAAA GTTAACCCCTC CTCAGGATTT	180
TGAGATAGTG GATTATGAAG AGAACCCGGA TACTTAGGTT ATCTCTATTT GCAATGGCAA	240
CCCCCACTGT CTCTGGATCA TTTTGTGTG TGAAAGGAAT GCACAGTGA ATATGAACATA	300
AAATACCGAA ACATTGGTAG TGAAACATGG AAGGCTAGTG TAGAGGTAC CATCATTACT	360
AAGAATCTAC ATTACAAAGA TGGGTTTGAT CTTAACAAGG GCATTGAATT ATAGAAGGGC	420
GAAGATACAC ACGCTTTTAC CATGGCAATG CACAAATGGA TCAGAAGTTC AAAGTTCCAA	480
TTGCTAGGAG TGGGCAGAAA CTACTTATTG GATATCACCA CAAGGAATTC CAGAACTAA	540
AGTTCAGGAT TAAGTTTGG GTAGAATGGA TTGCGTATAT TACAATTGGC AATATTACT	600
CTGTTCTTGG AAACCTGGCA TAGGTTACAT TATGTCTGGG TACTTCTGA TACCAATTAC	660
AACTTGTTTT ACTGGTATGA GGCCTTGGAT CATGCATTAA ATATATTGG AAACAGTGTG	720
TTGATTACAT CAAGGCTGAT GGACAAAATA TAGGATGCAG ATTTCCCTAT TTGGCAATAA	780

```

AGGAGCAGTG AGGCATCAGA CTATAAAGAT TTCTATATTT GTGTTAATGG ATCATCAGAG      840
AACAAAGCCTG AAATATCAAG GAATCAGATC CAGTTATTTC ACTTTTCAGC TTCAAAATAT      900
AGTTAAACCTT TTGCCGCCAG TCAGTTGGAA ATATCTTACT TTTACTCGGG AGAGTTCATG      960
TGAAATTAAG CTGAAATGGA GCATACCTTT GTTTAGGCGT GGACCTATTC CAGCAAGGTG     1020
TTTTGATTAT GAAATTGAGA TCAGAGAAGA TGATACTACC GAAAGCATGG AGGAATTTTG     1080
GTGACTGCTA CAGTTGAAAA TGAAACATAC ACCTTGAAAA CAACAAATGA AACCCGAATA     1140
ATAGAGTTTT TAGTAGCAAT TATGCTTTGT AGTAAGAAGC AAAGTGAATA TTTATTGCTC     1200
AGATGACGGA ATTTGGGCAA AGAATCAAGT AGTGAGTGGA GTGATAAACA ATGCTGGGAA     1260
GGTGAAGACC TATCGAAGAA AACTTTGCTA GTAGCTGGGA TCGTTTCTGG CTACCATTG      1320
GTTTCATCTT AATATTAGTT ATATTGTAA CCGGTCTGCT TAGTGAATGT TCGTAAGCC      1380
AAACACCTAC CCAAAAATGA TTCCAGAATT TTTCTGTGAT ACATGAAGAA GATTTGCATC     1440
TTTCCATATC AAGAGACATG GTATTGACTC AACAGTTTCC AGTCATGGCC AAATGTTCAA     1500
TATGAGTCTC AATAAACTGA ATTTTCTTG CGAATGTTG      1539

```

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 380 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

- (vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: Homo sapiens
 (F) TYPE DE TISSUE: Carcinoma
 (G) TYPE DE CELLULE: renal
 (H) LIGNEE CELLULAIRE: Caki-1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

```

Met Ala Phe Val Cys Leu Ala Ile Gly Cys Leu Tyr Thr Phe Leu Ile
 1           5           10           15
Ser Thr Thr Phe Gly Cys Thr Ser Ser Ser Asp Thr Glu Ile Lys Val
 20           25           30
Asn Pro Pro Gln Asp Phe Glu Ile Val Asp Pro Gly Tyr Leu Gly Tyr
 35           40           45
Leu Tyr Leu Gln Trp Gln Pro Pro Leu Ser Leu Asp His Phe Lys Glu
 50           55           60
Cys Thr Val Glu Tyr Glu Leu Lys Tyr Arg Asn Ile Gly Ser Glu Thr
 65           70           75           80
Trp Lys Thr Ile Ile Thr Lys Asn Leu His Tyr Lys Asp Gly Phe Asp
 85           90           95
Leu Asn Lys Gly Ile Glu Ala Lys Ile His Thr Leu Leu Pro Trp Gln
100          105          110
Cys Thr Asn Gly Ser Glu Val Gln Ser Ser Trp Ala Glu Thr Thr Tyr
115          120          125

```

Trp Ile Ser Pro Gln Gly Ile Pro Glu Thr Lys Val Gln Asp Met Asp
 130 135 140
 Cys Val Tyr Tyr Asn Trp Gln Tyr Leu Leu Cys Ser Trp Lys Pro Gly
 145 150 155 160
 Ile Gly Val Leu Leu Asp Thr Asn Tyr Asn Leu Phe Tyr Trp Tyr Glu
 165 170 175
 Gly Leu Asp His Ala Leu Gln Cys Val Asp Tyr Ile Lys Ala Asp Gly
 180 185 190
 Gln Asn Ile Gly Cys Arg Phe Pro Tyr Leu Glu Ala Ser Asp Tyr Lys
 195 200 205
 Asp Phe Tyr Ile Cys Val Asn Gly Ser Ser Glu Asn Lys Pro Ile Arg
 210 215 220
 Ser Ser Tyr Phe Thr Phe Gln Leu Gln Asn Ile Val Lys Pro Leu Pro
 225 230 235 240
 Pro Val Tyr Leu Thr Phe Thr Arg Glu Ser Ser Cys Glu Ile Lys Leu
 245 250 255
 Lys Trp Ser Ile Pro Leu Gly Pro Ile Pro Ala Arg Cys Phe Asp Tyr
 260 265 270
 Glu Ile Glu Ile Arg Glu Asp Asp Thr Thr Leu Val Thr Ala Thr Val
 275 280 285
 Glu Asn Glu Thr Tyr Thr Leu Lys Thr Thr Asn Glu Thr Arg Gln Leu
 290 295 300
 Cys Phe Val Val Arg Ser Lys Val Asn Ile Tyr Cys Ser Asp Asp Gly
 305 310 315 320
 Ile Trp Ser Glu Trp Ser Asp Lys Gln Cys Trp Glu Gly Glu Asp Leu
 325 330 335
 Ser Lys Lys Thr Leu Leu Arg Phe Trp Leu Pro Phe Gly Phe Ile Leu
 340 345 350
 Ile Leu Val Ile Phe Val Thr Gly Leu Leu Leu Arg Lys Pro Asn Thr
 355 360 365
 Tyr Pro Lys Met Ile Pro Glu Phe Phe Cys Asp Thr
 370 375 380

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 4009 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Homo sapiens
- (F) TYPE DE TISSUE: Carcinoma
- (G) TYPE DE CELLULE: RENAL
- (H) LIGNEE CELLULAIRE: Caki-1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

TCAGCCCCGC CGGGCTCCGA GCGAGAGGC TGCATGGAGT GGCCGGCGCG GCTCTGCGGG	60
CTGTGGGCGC TGCTGCTCTG CGCCGGCGGC GGGGGCGGG GCGGGGCGC CGCGCCTACG	120
GAAACTCAGC CACCTGTGAC AAATTTGAGT GTCTCTGTTG AAAACCTCTG CACAGTAATA	180
TGGACATGGA ATCCACCCGA GGGAGCCAGC TCAAATTGTA GTCTATGGTA TTTTAGTCAT	240
TTTGGCGACA AACAAGATAA GAAAATAGCT CCGGAACTC GTCGTTCAAT AGAAGTACCC	300
CTGAATGAGA GGATTTGTCT GCAAGTGGG TCCCAGTGTG GCACCAATGA GAGTGAGAAG	360
CCTAGCATTT TGGTTGAAAA ATGCATCTCA CCCCCAGAAG GTGATCCTGA GTCTGCTGTG	420
ACTGAGCTTC AATGCATTTG GCACAACCTG AGCTACATGA AGTGTCTTG GCTCCCTGGA	480
AGGAATACCA GTCCCGACAC TAACTATACT CTCTACTATT GGCACAGAAG CCTGGAAAAA	540
ATTCATCAAT GTGAAAACAT CTTTAGAGAA GGCCAATACT TTGGTTGTTT CTTTGATCTG	600
ACCAAAGTGA AGGATTCCAG TTTTGAACAA CACAGTGTC AAATAATGGT CAAGGATAAT	660
GCAGGAAAAA TTAAACCATC CTTCAATATA GTGCCTTTAA CTTCCCGTGT GAAACCTGAT	720
CCTCCACATA TTA AAAACCT CTCCTCCAC AATGATGACC TATATGTGCA ATGGGAGAAT	780
CCACAGAAAT TTATTAGCAG ATGCCTATTT TATGAAGTAG AAGTCAATAA CAGCCAACT	840
GAGACACATA ATGTTTTCTA CGTCCAAGAG GCTAAATGTG AGAATCCAGA ATTTGAGAGA	900
AATGTGGAGA ATACATCTTG TTTCATGGTC CCTGGTGTTC TTCCTGATAC TTTGAACACA	960
GTCAGAATAA GAGTCAAAAC AAATAAGTTA TGCTATGAGG ATGACAACT CTGGAGTAAT	1020
TGGAGCCAAG AAATGAGTAT AGGTAAGAAG CGCAATTCCA CACTCTACAT AACCATGTTA	1080
CTCATTGTTT CAGTCATCGT CGCAGGTGCA ATCATAGTAC TCCTGCTTTA CCTAAAAAGG	1140
CTCAAGATTA TTATATTCCC TCCAATTCCT GATCCTGGCA AGATTTTAA AGAAATGTTT	1200
GGAGACCAGA ATGATGATAC TCTGCACTGG AAGAAGTACG ACATCTATGA GAAGCAAACC	1260
AAGGAGGAAA CCGACTCTGT AGTGCTGATA GAAAACCTGA AGAAAGCCTC TCAGTGATGG	1320
AGATAATTIA TTTTACCTT CACTGTGACC TTGAGAAGAT TCTTCCCAT CTCCATTGT	1380
TATCTGGGAA CTTATTAAAT GGAACTGAA ACTACTGCAC CATTAAAAA CAGGCAGCTC	1440
ATAAGAGCCA CAGGTCTTTA TGTGAGTCG CGCACCAGAA AACTAAAAAT AATGGGCGCT	1500
TTGGAGAAGA GTGTGGAGTC ATTCTCATTG AATTATAAAA GCCAGCAGGC TTCAAACCTAG	1560
GGGACAAAGC AAAAAGTGAT GATAGTGGTG GAGTTAATCT TATCAAGAGT TGTGACAACT	1620
TCCTGAGGGA TCTATACTTG CTTTGTGTTT TTGTGTCAA CATGAACAAA TTTTATTTGT	1680
AGGGGAACCTC ATTTGGGGTG CAAATGCTAA TGTCAACTT GAGTCACAAA GAACATGTAG	1740
AAAACAAAAT GGATAAAATC TGATATGTAT TGTTTGGGAT CCTATTGAAC CATGTTTGTG	1800
GCTATTAAAA CTCTTTTAAC AGTCTGGGCT GGGTCCGGTG GCTCACGCCT GTAATCCCAG	1860
CAATTTGGGA GTCCGAGGCG GCGGATCAC TCGAGGTCAG GAGTTCCAGA CCAGCCTGAC	1920
CAAAATGGTG AAACCTCCTC TCTACTAAAA CTACAAAAAT TAACTGGGTG TGGTGGCGCG	1980
TGCCTGTAAT CCCAGCTACT CGGGAAGCTG AGGCAGGTGA ATTGTTTGAA CCTGGGAGGT	2040

GGAGGTTGCA GTGAGCAGAG ATCACACCAC TGCACCTAG CCTGGGTGAC AGAGCAAGAC 2100
TCTGTCTAAA AAACAAAACA AAACAAAACA AAACAAAAAA ACCTCTTAAT ATTCTGGAGT 2160
CATCATTTCC TCGACAGCA TTTTCCTCTG CTTTGAAAGC CCCAGAAATC AGTGTGGCC 2220
ATGATGACAA CTACAGAAAA ACCAGAGGCA GCTTCTTGC CAAGACCTTT CAAAGCCATT 2280
TTAGGCTGTT AGGGGCAGTG GAGGTAGAAT GACTCCTTGG GTATTAGAGT TTCAACCATG 2340
AAGTCTCTAA CAATGTATTT TCTTCACCTC TGCTACTCAA GTAGCATTTA CTGTGTCTTT 2400
GGTTTGTGCT AGGCCCCCGG GTGTGAAGCA CAGACCCCTT CCAGGGGTTT ACAGTCTATT 2460
TGAGACTCCT CAGTTCTTGC CACTTTTTTT TTTAATCTCC ACCAGTCATT TTTCAGACCT 2520
TTTAACTCCT CAATTCCAAC ACTGATTTCC CCTTTTGCAT TCTCCCTCCT TCCCTTCCTT 2580
GTAGCCTTTT GACTTTTCTT GGAAATTAGG ATGTAAATCT GCTCAGGAGA CCTGGAGGAG 2640
CAGAGGATAA TTAGCATCTC AGGTAAAGTG TGAGTAATCT GAGAAACAAT GACTAATCT 2700
TGCATATTTT GTAACCTCCA TGTGAGGGTT TTCAGCATTG ATATTGTGC ATTTTCTAAA 2760
CAGAGATGAG GTGGTATCTT CACGTAGAAC ATTGGTATTC GCTTGAGAAA AAAAGAATAG 2820
TTGAACCTAT TTCTCTTTCT TTACAAGATG GGTCCAGGAT TCCTCTTTTC TCTGCCATAA 2880
ATGATTAATT AAATAGCTTT TGTGTCTTAC ATTGGTAGCC AGCCAGCCAA GGCTCTGTTT 2940
ATGCTTTTGG GGGGCATATA TTGGGTTCCTA TTCTCACCTA TCCACACAAC ATATCCGTAT 3000
ATATCCCCCT TACTCTTACT TCCCCCAAAT TAAAGAAGT ATGGGAAATG AGAGGCATTT 3060
CCCCCACCCT ATTTCTCTCC TCACACACAG ACTCATATTA CTGGTAGGAA CTTGAGAACT 3120
TTATTTCCAA GTTGTTCAAA CATTTACCAA TCATATTAAT ACAATGATGC TATTTGCAAT 3180
TCCTGCTCCT AGGGGAGGGG AGATAAGAAA CCCTCACTCT CTACAGGTTT GGTACAAGT 3240
GGCAACCTGC TTCCATGGCC GTGTAGAAGC ATGGTGCCCT GGCTTCTCTG AGGAAGCTGG 3300
GGTTCATGAC AATGGCAGAT GTAAAGTTAT TCTTGAAGTC AGATTGAGGC TGGGAGACAG 3360
CCGTAGTAGA TGTCTACTT TGTCTGCTG TTCTCTAGAA AGAATATTTG GTTTTCCTGT 3420
ATAGGAATGA GATTAATTCC TTTCCAGGTA TTTTATAATT CTGGAAGCA AAACCCATGC 3480
CTCCCCCTAG CCATTTTAC TGTTATCCTA TTTAGATGGC CATGAAGAGG ATGCTGTGAA 3540
ATTCCCAACA AACATTGATG CTGACAGTCA TGCAGTCTGG GAGTGGGGAA GTGATCTTTT 3600
GTTCCCATCC TCTTCTTTTA GCAGTAAAT AGCTGAGGGA AAAGGGAGGG AAAAGGAAGT 3660
TATGGGAATA CCTGTGGTGG TTGTGATCCC TAGGTCTTGG GAGCTCTTGG AGGTGTCTGT 3720
ATCAGTGGAT TTCCCATCCC CTGTGGGAAA TTAGTAGGCT CATTTACTGT TTTAGGTCTA 3780
GCCTATGTGG ATTTTTCCT AACATACCTA AGCAAACCCA GTGTCAGGAT GGTAATTCTT 3840
ATCTTTTCGT TCAGTTAAGT TTTCCCTTC ATCTGGGCAC TGAAGGGATA TGTGAACAA 3900
TGTTAACATT TTTGGTAGTC TTCAACCAGG GATTGTTTCT GTTTAACTTC TTATAGGAAA 3960
GCTTGAGTAA AATAAATATT GTCTTTTGT ATGTCACCCA AAAAAAAA 4009

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 427 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

- (vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: Homo sapiens
 (F) TYPE DE TISSUE: Carcinoma
 (G) TYPE DE CELLULE: renal
 (H) LIGNEE CELLULAIRE: Caki-1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

```

Met Glu Trp Pro Ala Arg Leu Cys Gly Leu Trp Ala Leu Leu Leu Cys
1          5          10          15
Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Pro Thr Glu Thr Gln
20          25          30
Pro Pro Val Thr Asn Leu Ser Val Ser Val Glu Asn Leu Cys Thr Val
35          40          45
Ile Trp Thr Trp Asn Pro Pro Glu Gly Ala Ser Ser Asn Cys Ser Leu
50          55          60
Trp Tyr Phe Ser His Phe Gly Asp Lys Gln Asp Lys Lys Ile Ala Pro
65          70          75          80
Glu Thr Arg Arg Ser Ile Glu Val Pro Leu Asn Glu Arg Ile Cys Leu
85          90          95
Gln Val Gly Ser Gln Cys Ser Thr Asn Glu Ser Glu Lys Pro Ser Ile
100         105         110
Leu Val Glu Lys Cys Ile Ser Pro Pro Glu Gly Asp Pro Glu Ser Ala
115         120         125
Val Thr Glu Leu Gln Cys Ile Trp His Asn Leu Ser Tyr Met Lys Cys
130         135         140
Ser Trp Leu Pro Gly Arg Asn Thr Ser Pro Asp Thr Asn Tyr Thr Leu
145         150         155         160
Tyr Tyr Trp His Arg Ser Leu Glu Lys Ile His Gln Cys Glu Asn Ile
165         170         175
Phe Arg Glu Gly Gln Tyr Phe Gly Cys Ser Phe Asp Leu Thr Lys Val
180         185         190
Lys Asp Ser Ser Phe Glu Gln His Ser Val Gln Ile Met Val Lys Asp
195         200         205
Asn Ala Gly Lys Ile Lys Pro Ser Phe Asn Ile Val Pro Leu Thr Ser
210         215         220
Arg Val Lys Pro Asp Pro Pro His Ile Lys Asn Leu Ser Phe His Asn
225         230         235         240
Asp Asp Leu Tyr Val Gln Trp Glu Asn Pro Gln Asn Phe Ile Ser Arg
245         250         255
Cys Leu Phe Tyr Glu Val Glu Val Asn Asn Ser Gln Thr Glu Thr His
260         265         270

```

Asn Val Phe Tyr Val Gln Glu Ala Lys Cys Glu Asn Pro Glu Phe Glu
 275 280 285
 Arg Asn Val Glu Asn Thr Ser Cys Phe Met Val Pro Gly Val Leu Pro
 290 295 300
 Asp Thr Leu Asn Thr Val Arg Ile Arg Val Lys Thr Asn Lys Leu Cys
 305 310 315 320
 Tyr Glu Asp Asp Lys Leu Trp Ser Asn Trp Ser Gln Glu Met Ser Ile
 325 330 335
 Gly Lys Lys Arg Asn Ser Thr Leu Tyr Ile Thr Met Leu Leu Ile Val
 340 345 350
 Pro Val Ile Val Ala Gly Ala Ile Ile Val Leu Leu Leu Tyr Leu Lys
 355 360 365
 Arg Leu Lys Ile Ile Ile Phe Pro Pro Ile Pro Asp Pro Gly Lys Ile
 370 375 380
 Phe Lys Glu Met Phe Gly Asp Gln Asn Asp Asp Thr Leu His Trp Lys
 385 390 395 400
 Lys Tyr Asp Ile Tyr Glu Lys Gln Thr Lys Glu Glu Thr Asp Ser Val
 405 410 415
 Val Leu Ile Glu Asn Leu Lys Lys Ala Ser Gln
 420 425

REVENDICATIONS

1. Polypeptide purifié, comprenant une séquence d'acides aminés choisie
5 parmi :
 - a) la séquence SEQ ID n° 2,
 - b) toute séquence biologiquement active dérivée de SEQ ID n° 2.
2. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend la
10 séquence d'acides aminés SEQ ID n° 2.
3. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une
 forme variante du polypeptide de séquence SEQ ID n°2 dans laquelle les
 8 résidus C-terminaux sont substitués par les 6 résidus suivants :
15 VRCVTL.
4. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une
 forme soluble s'étendant jusqu'au résidu 343 et préférentiellement jusqu'au
 résidu 337.
20
5. Séquence d'acides nucléiques isolée codant pour un polypeptide selon
 l'une quelconque des revendications 1 à 4.
6. Séquence d'acides nucléiques isolée selon la revendication 5, caractérisée
25 en ce qu'elle est choisie parmi :
 - a) la séquence SEQ ID n° 1,
 - b) les séquences d'acides nucléiques capables de s'hybrider à la séquence
 SEQ ID n° 1 et codant pour un polypeptide ayant une activité de
 récepteur β de l'IL-13,

c) les séquences d'acides nucléiques dérivées des séquences a) et b) du fait de la dégénérescence du code génétique.

- 5 7. Séquence d'acides nucléiques selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par l'enchaînement de nucléotides s'étendant du nucléotide n° 1 jusqu'au nucléotide 1081 et préférentiellement jusqu'au nucléotide 1063 sur la séquence SEQ ID n° 1.
- 10 8. Polypeptide purifié, comprenant une séquence d'acides aminés choisie parmi :
a) la séquence SEQ ID n° 4,
b) toute séquence biologiquement active dérivée de SEQ ID n° 4.
- 15 9. Polypeptide selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence d'acides aminés SEQ ID n° 4.
- 20 10. Polypeptide selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une forme soluble s'étendant jusqu'au résidu 343 et préférentiellement jusqu'aux résidus compris entre 336 et 342.
- 25 11. Séquence d'acides nucléiques isolée codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 8 à 10.
12. Séquence d'acides nucléiques isolée selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi :
a) la séquence SEQ ID n°3,

- b) les séquences d'acides nucléiques capables de s'hybrider à la séquence SEQ ID n° 3 et codant pour un polypeptide ayant une activité de récepteur α de l'IL-13,
- c) les séquences d'acides nucléiques dérivées des séquences a) et b) du fait de la dégénérescence du code génétique.

5

13. Séquence d'acides nucléiques selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par l'enchaînement de nucléotides s'étendant du nucléotide n° 1 jusqu'au nucléotide 1059, et préférentiellement jusqu'aux nucléotides compris entre 1041 et 1056 sur la séquence SEQ ID n° 3.

10

14. Vecteur de clonage et/ou d'expression contenant une séquence d'acides nucléiques selon l'une quelconque des revendications 5 à 7 et 11 à 13.

15

15. Vecteur selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il s'agit du plasmide PSE-1.

20

16. Cellule hôte transfectée par un vecteur selon la revendication 14 ou 15.

17. Cellule hôte transfectée selon la revendication 16, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de la lignée COS-7, COS-3 ou CHO.

25

18. Sonde nucléotidique caractérisée en ce qu'elle hybride spécifiquement avec l'une quelconque des séquences selon les revendications 5 à 7, leurs séquences complémentaires ou les ARN messagers correspondants.

19. Sonde selon la revendication 18, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins 10 nucléotides.
- 5 20. Sonde selon la revendication 18, caractérisée en ce qu'elle comprend l'intégralité de la séquence SEQ ID n° 1 ou de son brin complémentaire.
- 10 21. Sonde nucléotidique caractérisée en ce qu'elle hybride spécifiquement avec l'une quelconque des séquences selon les revendications 11 à 13, leurs séquences complémentaires ou les ARN messagers correspondants.
- 15 22. Sonde selon la revendication 21, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins 10 nucléotides
23. Sonde nucléotidique caractérisée en ce qu'elle comprend l'intégralité de la SEQ ID n°3 ou de son brin complémentaire.
- 20 24. Séquence antisens capable d'inhiber, au moins partiellement, la production de polypeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et 8 à 10, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les séquences constituant le cadre de lecture codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et 8 à 10 au niveau du transcript.
- 25 25. Utilisation d'une séquence selon l'une quelconque des revendications 5 à 7 et 11 à 13, pour la réalisation de sondes nucléotidiques de diagnostic ou de séquences antisens utilisables en thérapie génique.

26. Utilisation d'une sonde selon l'une quelconque des revendications 18 à 23, comme outil de diagnostic *IN VITRO* pour la détection, par hybridation, des séquences d'acides nucléiques codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou 8 à 10, dans des échantillons biologiques, ou pour la mise en évidence de synthèses aberrantes ou d'anomalies génétiques telles que la perte d'hétérozygotie ou le réarrangement génétique.
27. Utilisation d'une sonde selon l'une quelconque des revendications 18 à 23, pour la détection d'anomalies chromosomiques.
28. Méthode de diagnostic *IN VITRO* pour la détection de synthèses aberrantes ou d'anomalies génétiques au niveau des séquences d'acides nucléiques codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou 8 à 10, caractérisée en ce qu'elle comprend :
- la mise en contact d'une sonde nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 19 à 23 avec un échantillon biologique dans des conditions permettant la formation d'un complexe d'hybridation entre ladite sonde et la susdite séquence nucléotidique, éventuellement après une étape préalable d'amplification de la susdite séquence nucléotidique ;
 - la détection du complexe d'hybridation éventuellement formé ;
 - éventuellement le séquençage de la séquence nucléotidique formant le complexe d'hybridation avec la sonde de l'invention.
29. Utilisation d'une séquence d'acides nucléiques selon l'une quelconque des revendications 5 à 7 et 11 à 13 pour la production d'un polypeptide recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et 8 à 10.

30. Méthode de production d'un polypeptide recombinant récepteur de l'IL-13, caractérisée en ce que l'on cultive des cellules transfectées selon la revendication 16 ou 17 dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide recombinant de séquence SEQ ID n° 2 ou de séquence SEQ ID n° 4 ou dérivée, et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant.
31. Anticorps mono ou polyclonaux, anticorps conjugués, ou leur fragments, caractérisés en ce qu'ils sont capables de reconnaître spécifiquement un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et 8 à 10.
32. Utilisation des anticorps selon la revendication précédente, pour la purification ou la détection d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et 8 à 10 dans un échantillon biologique.
33. Procédé de diagnostic *IN VITRO* de pathologies corrélées à une expression anormale du récepteur de l'IL-13, à partir de prélèvements biologiques susceptibles de contenir le récepteur de l'IL-13 exprimé à un taux anormal, caractérisé en ce que l'on met en contact au moins un anticorps selon la revendication 31 avec ledit prélèvement biologique, dans des conditions permettant la formation éventuelle de complexes immunologiques spécifiques entre le récepteur de l'IL-13 et le ou lesdits anticorps et en ce que l'on détecte les complexes immunologiques spécifiques éventuellement formés.
34. Kit pour le diagnostic *IN VITRO* d'une expression anormale du récepteur de l'IL-13 dans un prélèvement biologique et/ou pour la mesure du taux d'expression du récepteur de l'IL-13 dans ledit prélèvement comprenant :

- au moins un anticorps spécifique du récepteur de l'IL-13 selon la revendication 31, éventuellement fixé sur un support,
- des moyens de révélation de la formation de complexes antigènes/anticorps spécifiques entre le récepteur de l'IL-13 et ledit anticorps et/ou des moyens de quantification de ces complexes.

5

35. Méthode pour l'identification et/ou l'isolement de polypeptides selon la revendication 1 ou 8, ou d'agents capables de moduler leur activité, caractérisée en ce que l'on met en contact un composé ou un mélange contenant différents composés, éventuellement non-identifiés, avec des cellules exprimant à leur surface un polypeptide selon la revendication 1 ou 8, dans des conditions permettant l'interaction entre le polypeptide et ledit composé dans le cas où celui-ci posséderait une affinité pour le polypeptide, et en ce que l'on détecte et/ou isole les composés liés au polypeptide ou ceux capables d'en moduler l'activité biologique.

10

15

36. Ligand ou modulateur d'un polypeptide tel que défini dans les revendications 1 à 4 ou 8 à 10 susceptible d'être obtenu selon la méthode de la revendication 35.

20

37. Composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif, un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou 8 à 10.

38. Composition pharmaceutique selon la revendication précédente, caractérisée en ce qu'elle comprend un polypeptide selon la revendication 4 ou 10.

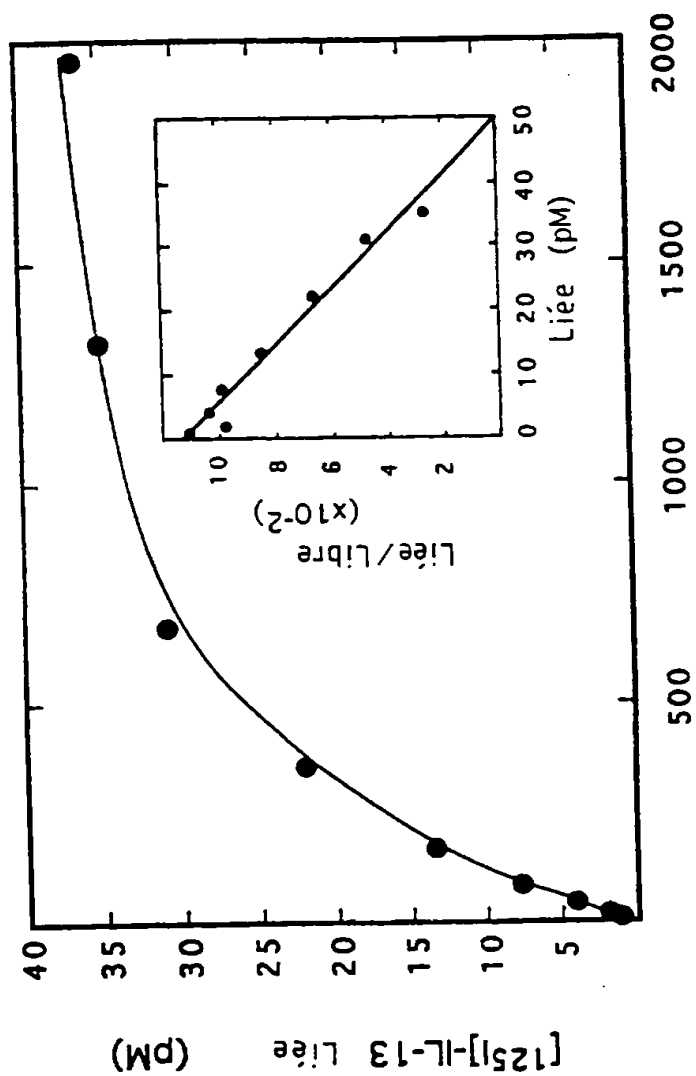
25

39. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, pour le criblage d'agents capables de moduler l'activité de l'IL-13R β .
- 5 40. Utilisation d'un polypeptide selon l'un quelconque des revendications 8 à 10 pour le criblage d'agents capables de moduler l'activité de l'IL-13R α .
- 10 41. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, pour la fabrication de produits capables de moduler l'activité de l'IL-13R β .
- 15 42. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 8 à 10 pour la fabrication de produits capables de moduler l'activité de l'IL-13R α .
43. Utilisation d'un polypeptide selon la revendication 4 ou 10 pour la synthèse d'un médicament à effet antagoniste de l'IL-13.

REVENDICATIONS MODIFIEES

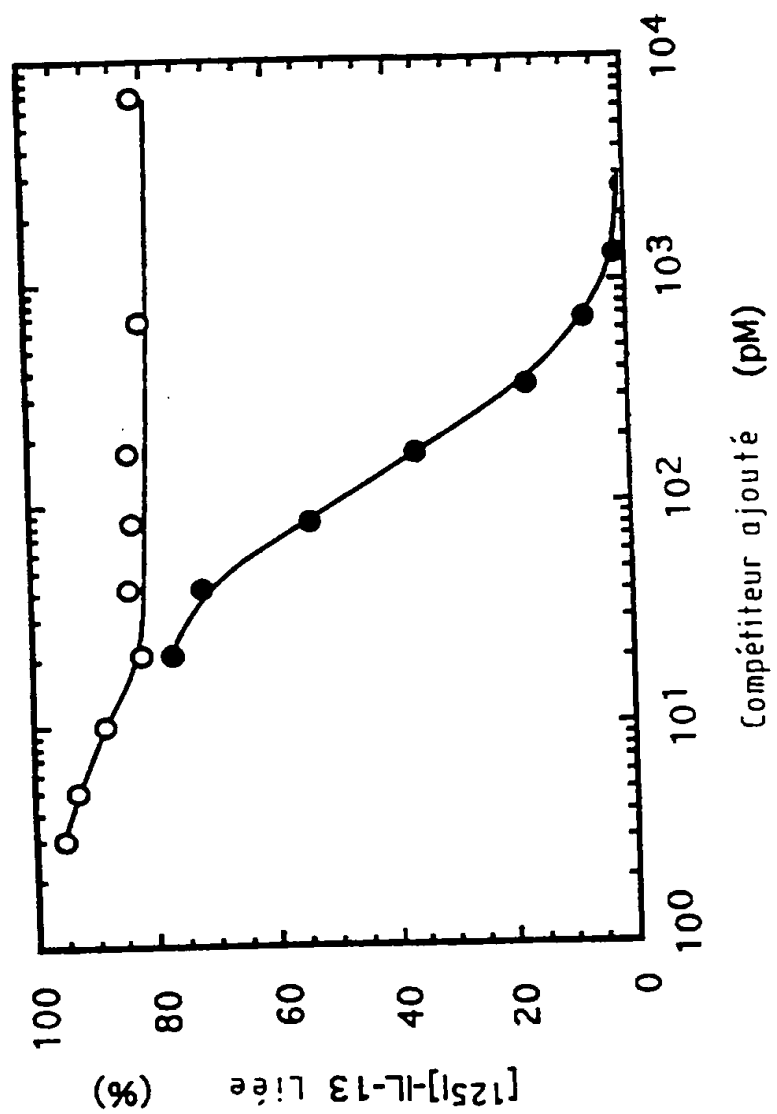
[reçues par le Bureau International le 16 avril 1997 (16.04.97);
revendication 28 modifiée; autres revendications inchangées (1 page)]

26. Utilisation d'une sonde selon l'une quelconque des revendications 18 à 23, comme outil de diagnostic *IN VITRO* pour la détection, par hybridation, des séquences d'acides nucléiques codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou 8 à 10, dans des échantillons biologiques, ou pour la mise en évidence de synthèses aberrantes ou d'anomalies génétiques telles que la perte d'hétérozygotie ou le réarrangement génétique.
27. Utilisation d'une sonde selon l'une quelconque des revendications 18 à 23, pour la détection d'anomalies chromosomiques.
28. Méthode de diagnostic *IN VITRO* pour la détection de synthèses aberrantes ou d'anomalies génétiques au niveau des séquences d'acides nucléiques codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou 8 à 10, caractérisée en ce qu'elle comprend :
- la mise en contact d'une sonde nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 18 à 23 avec un échantillon biologique dans des conditions permettant la formation d'un complexe d'hybridation entre ladite sonde et la susdite séquence nucléotidique, éventuellement après une étape préalable d'amplification de la susdite séquence nucléotidique ;
 - la détection du complexe d'hybridation éventuellement formé ;
 - éventuellement le séquençage de la séquence nucléotidique formant le complexe d'hybridation avec la sonde de l'invention.
29. Utilisation d'une séquence d'acides nucléiques selon l'une quelconque des revendications 5 à 7 et 11 à 13 pour la production d'un polypeptide recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et 8 à 10.



$[^{125}\text{I}]\text{-IL-13 (pM)}$

FIG. 1a

FIG.1b

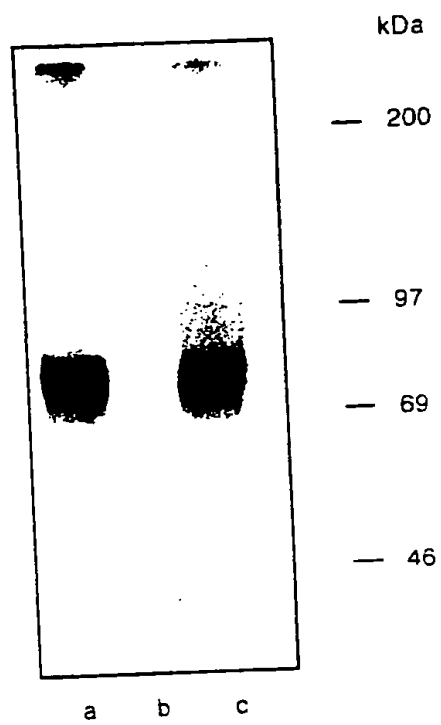


FIG.1c

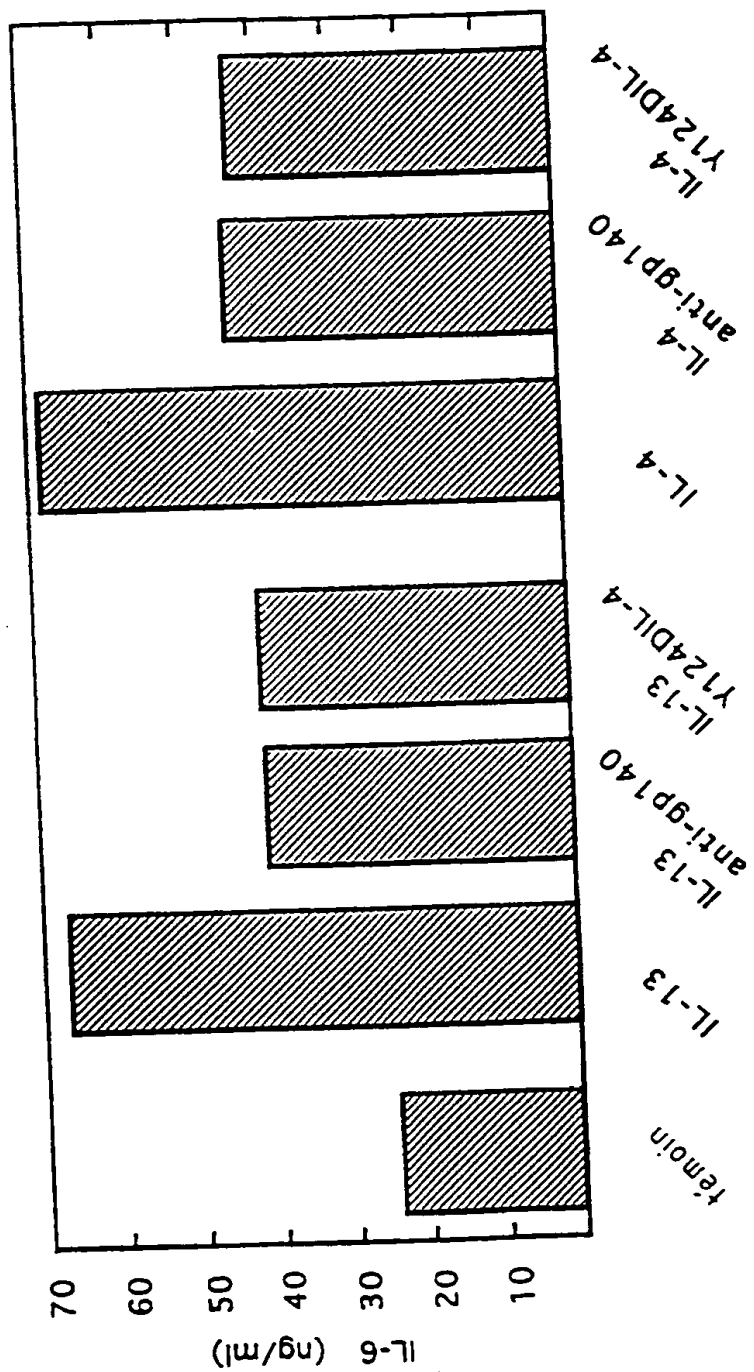


FIG.1d

1	GGTGCCTGTCGGCGGAGAGAGGCAATATCAAGTTTAAATCTCGGAGAAATGGCT	58
1	MetAla	2
59	TTCGTTTGGCTATCGGATGCTTATATACCTTTCTGATAGGACAACATTTGGCTGT	118
3	PheValCysLeuAlaIleGlyCysLeuTyrThrPheLeuIleSerThrThrPheGlyCys	22
119	ACTTCATCTTCAGACACCGAGATAAAGTTAACCTCCTCAGGATTTTGAGATAGTGGAT	178
23	ThrSerSerAspThrGluIleLysValAsnProProGlnAspPheGluIleValAsp	42
179	CCCGATACTTAGGTTATCTCTATTTGCAATGGCAACCCCACTGTCTCTGGATCATTTT	238
43	ProGlyTyrLeuGlyTyrLeuTyrLeuGlnTrpGlnProProLeuSerLeuAspHisPhe	62
239	AAGGAATGCACAGTGGAAATATGAACCTAAATACCGAAACATTTGGTAGTGAAACATGGAAG	298
63	LysGluCysThrValGluTyrGluLeuLysTyrArgAsnIleGlySerGluThrTrpLys	82
299	ACCATCATTAAGAACTACATTACAAAGATGGGTTTGATCTTAACAGGGCATTTGAA	358
83	ThrIleIleThrLysAsnLeuHisTyrLysAspGlyPheAspLeuAsnLysGlyIleGlu	102
359	GCGAAGATACACACGCTTTTACCATGGCAATGCACAAATGGATCAGAACTCAAAGTTCC	418
103	AlaLysIleHisThrLeuLeuProTrpGlnCysThrAsnGlySerGluValGlnSerSer	122
419	TGGCAGAAACTACTTATTGGATATCACCACAAGGAATCCAGAACTAAAGTTCAGGAT	478
123	TrpAlaGluThrThrTyrTrpIleSerProGlnGlyIleProGluThrLysValGlnAsp	142
479	ATGGATTGCGTATATACAATTGGCAATATTTACTCTGTTCTTGGAACCTGGCATAGGT	538
143	MetAspCysValTyrTyrAsnTrpGlnTyrLeuLeuCysSerTrpLysProGlyIleGly	162
539	GTACTTCTTGATACCAATTACAACCTGTTTACTGGTAAGGGCTTGGATCATGCATTA	598
163	ValLeuLeuAspThrAsnTyrAsnLeuPheTyrTrpTyrGluGlyLeuAspHisAlaLeu	182
599	CAGTGTGTGATTACATCAAGGCTGATGACAAAATATAGGATGCAGATTCCTATTG	658
183	GlnCysValAspTyrIleLysAlaAspGlyGlnAsnIleGlyCysArgPheProTyrLeu	202

FIG. 2a

659	GAGGCATCAGACTATAAAGATTCTCTATATTTGTGTTAATGGATCATCAGACAAGCCT	718
203	GluAlaSerAspTyrLysAspPheTyrIleCysValAsnGlySerSerGluAsnLysPro	222
719	ATCAGATCCAGTTATTTCACTTTTCAGCTTCAAAATATAGTTAAACCTTTGCCGCCAGTC	778
223	IleArgSerSerTyrPheThrPheGlnLeuGlnAsnIleValLysProLeuProVal	242
779	TATCTTACTTTTACTCGGAGAGTTTCATGTGAAATTAAGCTGAAATGGAGCATACCTTTG	838
243	TyrLeuThrPheThrArgGluSerSerCysGluIleLysLeuLysTyrSerIleProLeu	262
839	GGACCTATTCCAGCAAGGTGTTTTGATTATGAAATTGAGATCAGAGAAGATGATACTACC	898
263	GlyProIleProAlaArgCysPheAspTyrGluIleGluIleArgGluAspThrThr	282
899	TTGGTGACTGCTACAGTTGAAATGAAACATACACCTTGAAACAAACAATGAAACCCGA	958
283	LeuValThrAlaThrValGluAsnGluThrTyrThrLeuLysThrThrAsnGluThrArg	302
959	CAATTATGCTTTGTAGTAAGACAAAGTGAATATTTATTCCTCAGATGACGGAATTTGG	1018
303	GlnLeuCysPheValValArgSerLysValAsnIleTyrCysSerAspAspGlyIleTyr	322
1019	AGTGAGTGGAGTGATAAACAAATGCTGGGAAGGTGAAGACCTATCGAAGAAACTTTGCTA	1078
323	SerGluTyrSerAspLysGlnCysTyrGluGlyGluAspLeuSerLysLysThrLeuLeu	342
1079	CGTTTCTGGCTACCATTTGGTTTCATCTTAATATAGTTATATTTGTAAACCGGCTGCTT	1138
343	ArgPheTyrLeuProPheGlyPheIleLeuIleLeuValIlePheValThrGlyLeuLeu	362
1139	TTGCGTAAGCCAAACACCTACCCAAAATGATTCACGAATTTTCTGTGATACATGAAGA	1198
363	LeuArgLysProAsnThrTyrProLysMetIleProGluPhePheCysAspThr	381
1199	CTTTCCATATCAAGACATGGTATTGACTCAACAGTTTCCAGTCATGCCAAATGTTCA	1258
1259	ATATGAGTCTCAATAAAGTGAATTTTCTTGGCAATGTTG	1298

FIG. 2a (suite)

```

IL13R  MAFVCLAIGCLYTFLLISTTFFGCTSSSDTEIKVNPPQDFEIVDPGYLGILY 50
      ..MIIVAHVLLILLGATEILLQADLLPDEKISLLPPVNFITIKVTG.LAQVL 47
IL13R  LQWQPPLSLDHFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIITKNLHYKDGFDLNKG 100
      LQWKPNPDQEQ.PNVNLEYQVKINAPKEDDYETRITES...KCVTILHKG 93
IL13R  IEAKIHTLLPWQTTNGSEVQSSWAETTYWISPOGIPETKVQDMDV.... 146
      FSASVRTILQ...NDHSELLASSWASAE.LHAPPGSPGTSIVNLTITTTNTT 139
IL13R  ..YYNWQ.....ILSWKPGIGVLDDTNYNLFYWYEGLDHALQVVDYIK 189
      EDNYSRLRSYQVSLHCTWLVGTDAPEDTQYFLYYRYGSWTE..EQEYSK 187
IL13R  AD.GONIGCRFP..YLEASDYKDFYICVNGSSSENKPIRSSYFTFQLQNI 236
      DTLGRNIAQWFPPTFILSKGRDWLSVLVNGSSKHSAIRPFDQLFALHAID 237
IL13R  KPLPPVYLTFTRSSCEIKLWSIPLGPIPARCFDYEIEIREDDTTLVTA 286
      QINPPLNVTAEIEGT.RLSIQWEKPVSAFPINCFDYEYVKIHNTRNGYLQI 286
IL13R  TVENETYTLKTTNETRQLCFVVRSKVNIYCSDDGILWSEWSKQKCWEGEDL 336
      EKLMTNAFISIIIDLSKYDVQVRAAVSSMCREAGILWSEWSQ.PIYVGND 335
IL13R  SKKTLLRFWLPFGFILILVIFVTGLLLRKPNPTYPKMIP.....EF 376
      HKPLREWVFVIVIMATICFILLILSLICKICHLWIKLFPPIPAPKSNIKDL 385
IL13R  FCDT..... 380
      FVTTNIEKAGSSETEIEVICYIEKPGVETLEDSVF 420

```

FIG. 2b

8/19

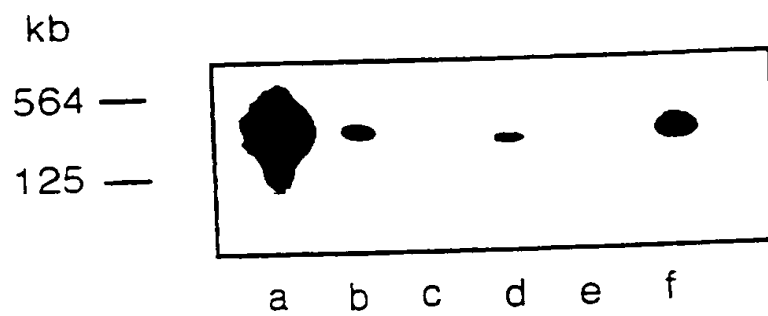


FIG.3

9/19

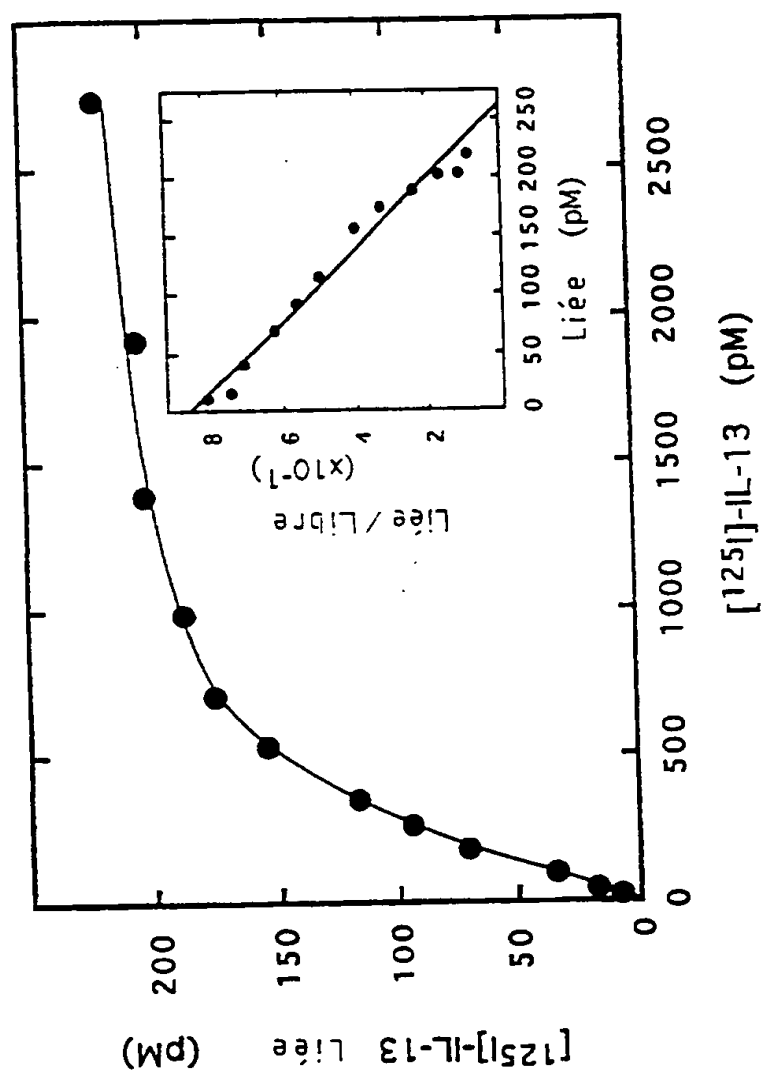


FIG. 4d

10/19

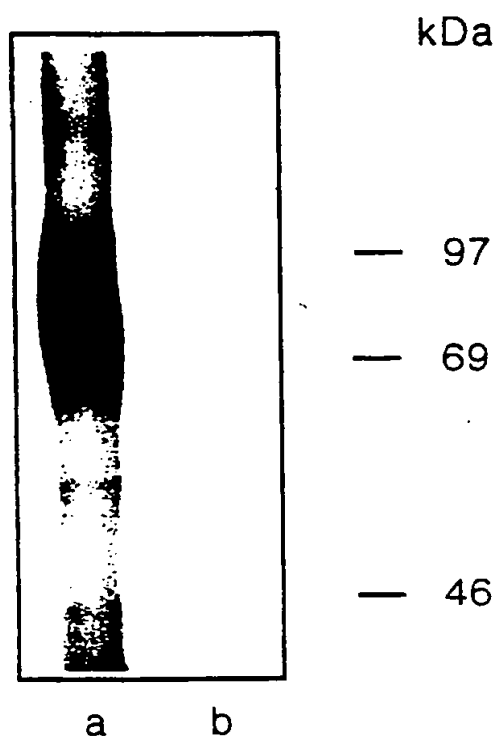


FIG.4b

11/19

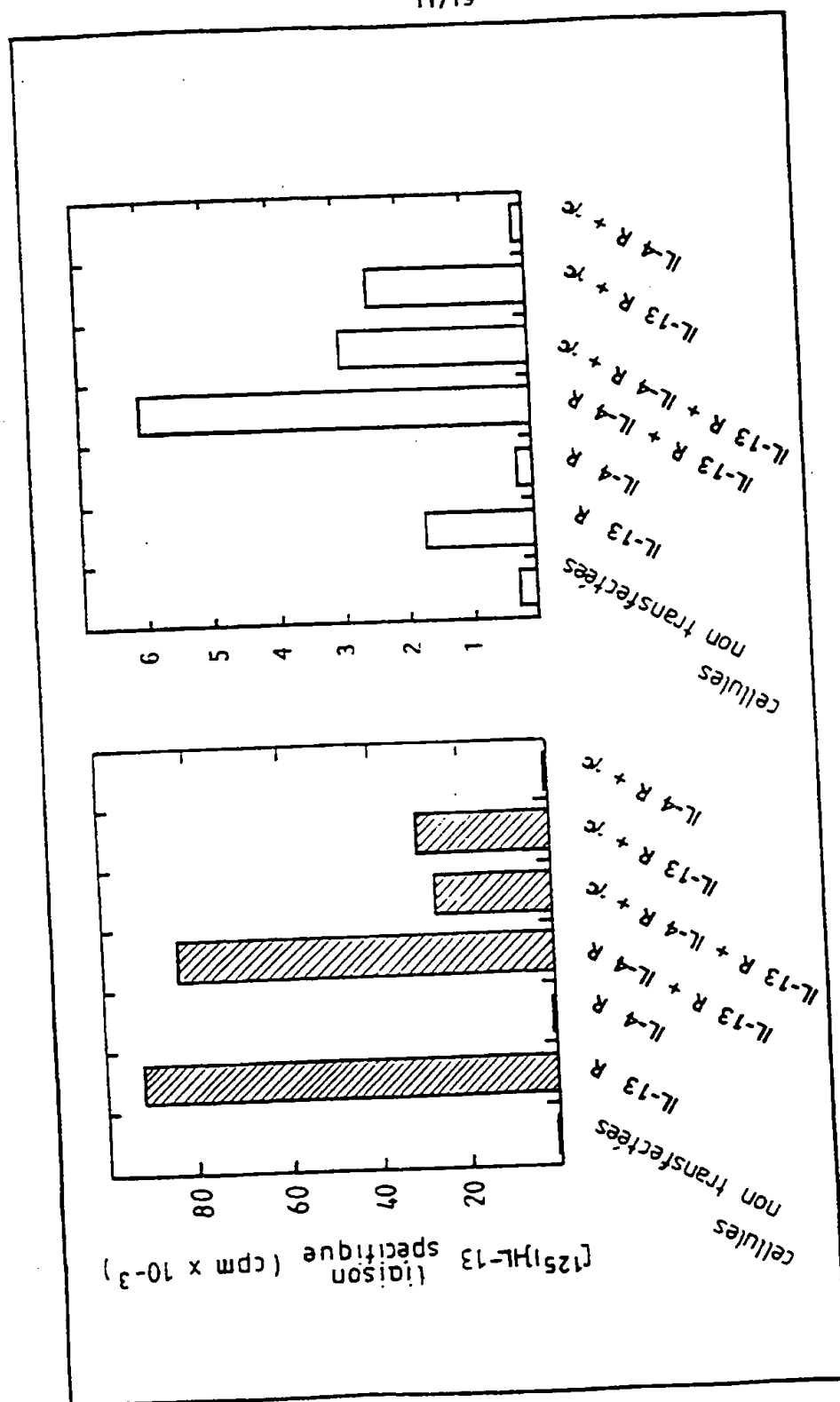
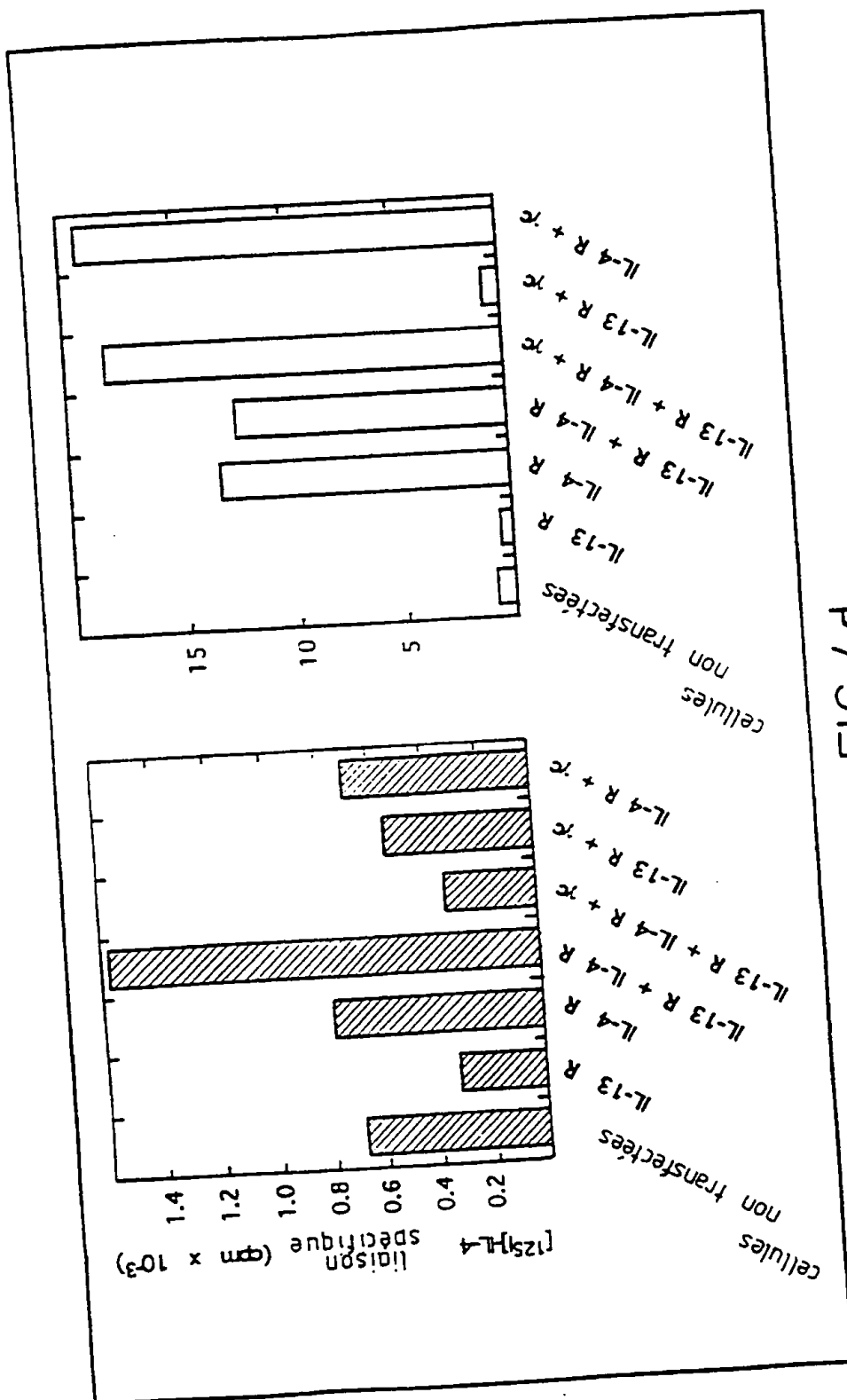


FIG. 4C



13/19

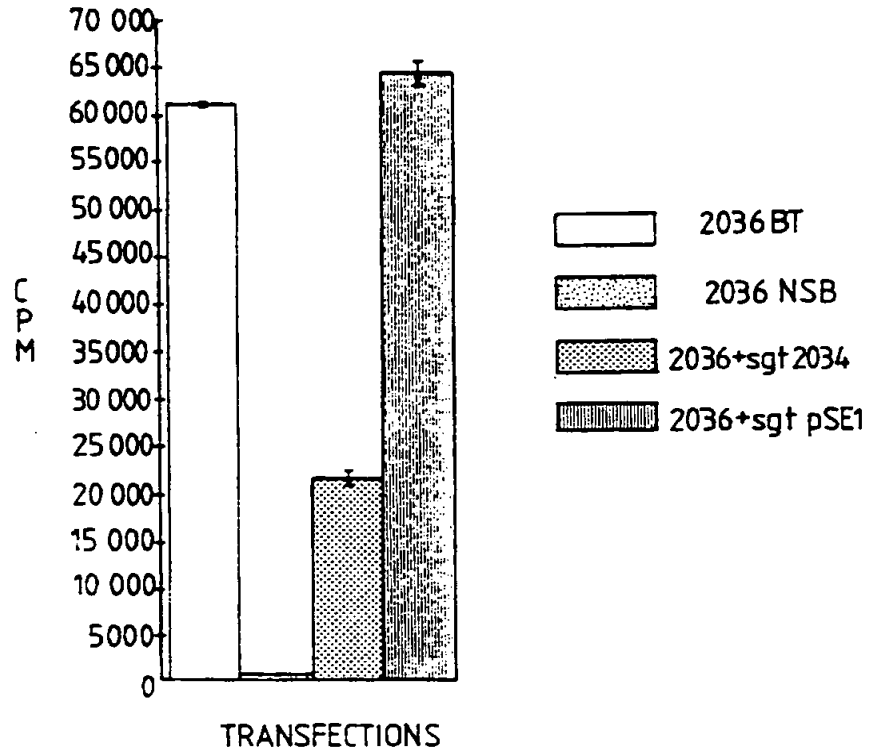
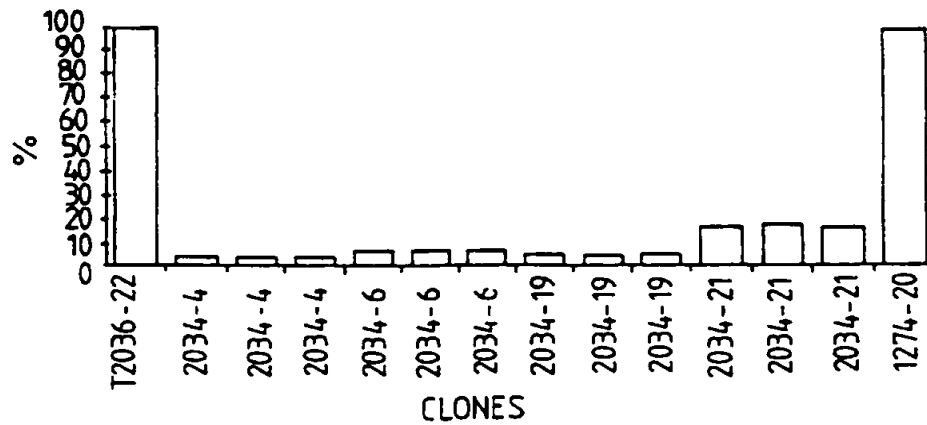


FIG. 5

FIG. 6



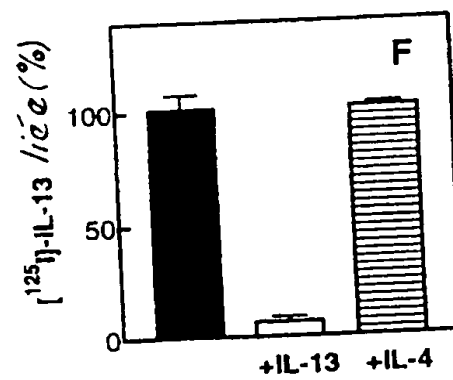
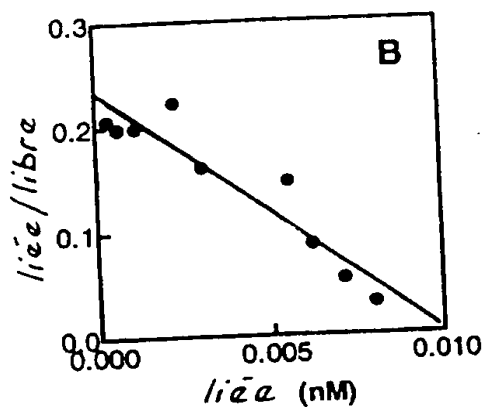
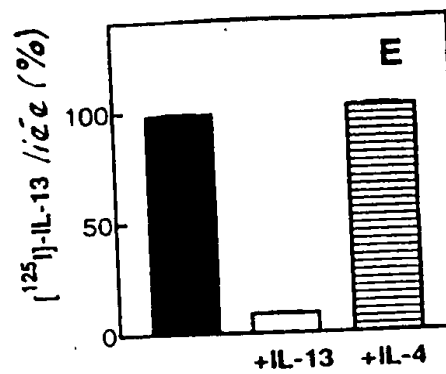
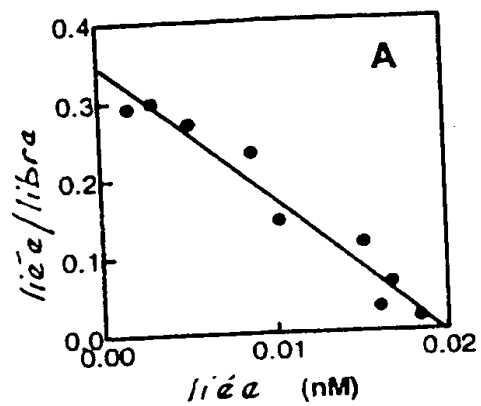
[illegible]

FIG. 7a

1381 TATCTGGGAACCTTATTTAAATGGAACTGAAAC'TAC'GACACCATTAAAAACAGGCAGCTC 1440
1441 ATAAGAGCCACAGG'TCTTTATGTTGAGTCGCGCACC'GAAAACTAAAAATAATGGGCGCT 1500
1501 TTGGAGAAGAGTGTGGAGTCAT'TCTCATTGAATTATAAAAGCCAGCAGGCTTCAAAC'TAG 1560
1561 GGGACAAAGCAAAAAGTGATGATAGTGCTGGAGTTAATCTTATCAAGAGTTGTGACAACT 1620
1621 TCCTGAGGGATCTATAC'TTGCTTTGTGTTCTTTGTGTCAACATGAACAAATTTTATTTGT 1680
1681 AGGGGAAC'TCATT'TGGGGTGCAAATGCTAATGTCAAAC'TTGAG'TCACAAAGAACATGTAG 1740
1741 AAAACAAAATGGATAAAAATCTGATATGTATTGTT'TGGGATCCTATTGAACCATGTTTGTG 1800
1801 GCTATTTAAAC'TCTTTTAACAGTCTGGGCTGGGTCCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAG 1860
1861 CAATTTGGGAGTCCGAGGCGGGCGGATCACTCGAGGTCAGGAGTTCCAGACCAGCCTGAC 1920
1921 CAAAATGGTGAAACCTCCTCTCTACTAAAC'TACAAAAATTAAC'TGGGTGTGGTGGCGCG 1980
1981 TGCCTGTAATCCCAGCTACTCGGGAAGCTGAGGCAGGTGAAT'TGTTGAACCTGGGAGGT 2040
2041 GGAGGTTGCAGTGAGCAGAGATCACACC'ACTGCAC'TCTAGCCTGGGTGACAGAGCAAGAC 2100
2101 TCTGTCTAAAAAACAAAAACAAAAACAAAAACAAAAACCTCTTAATATTCTGGAGT 2160
2161 CATCATTCCTCTTCGACAGCATTTTCTCTGCTTGTGAAAGCCCCAGAAATCAGTGT'TGGCC 2220
2221 ATGATGACAAC'TACAGAAAACCAAGAGGCAGCTTCTTTGCCAAGACCTTTCAAAAGCCATT 2280
2281 TTAGGCTGT'TAGGGGCGAGTGAGGTAqaaTGACTCCTTGGGTATTAGAGT'TTCAACCATG 2340
2341 AAGTCTCTAACAATG'TaT'TTCTTTCACCTCTGCTACTCAAGTAGCATTTACTGTGTCTTT 2400
2401 GGTTTGTGCTAGGCCCGGGGTGTGAAGCACAGACCCCTTCCAGGGGTTTACAGTCTAT 2460
2461 TGAGACTCCTCAGTTCCTTGCCACTTTTTTTTTTAATCTCCACCAGTCAATTTTCAGACCT 2520
2521 TTTAACTCCTCAAT'TCCAACACTGATTTCCCTCTTTGCATTCTCCCTCCTTCCCTT 2580
2581 GTAGCCTTTTGACTTTTCAAT'TGGAAATTAGGATGTAATCTGCTCAGGAGACCTGGAGGAG 2640
2641 CAGAGGATAATTAGCATCTCAGGTTAAGTGAGTAATCTGAGAAACAATGACTAATCT 2700
2701 TGCATATTTGTAACTTCCATGTGAGGGTTTTTCAGCATTGATATTTGTGCATTTTCTAAA 2760
2761 CAGAGATGAGGTGGTATCTTACGTAGAACATTGGTATTCGCTTGAGAAAAAAGAATAG 2820
2821 TTGAACCTATTTCTCTTTCTTTTACAAGATGGGTCCAGGATTCCTCTTTTCTCTGCCATAA 2880
2881 ATGATTAATTAATAGCTTTTGTGTCTTACATTGGTAGCCAGCCAGCCAAGGCTCTGTTT 2940
2941 ATGCTTTTGGGGGGCATATATTGGGTTCATTCTCACCTATCCACACAACATATCCGTAT 3000
3001 ATATCCCTCTACTCTTACTTCCCCCAAATTTAAAGAAGTATGGGAAATGAGAGGCATTT 3060
3061 CCCCCACCCCATTTCTCTCCTCACACACAGACTCATATTAAATACAATGATGCTATTTGCAAT 3120
3121 TTATTTCCAAGTTGTTCAAACATTTTACCAATCATATTAATACAATGATGCTATTTGCAAT 3180
3181 TCCTGCTCCTAGGGGAGGGAGATAAGAAACCTCACTCTCTACAGGTTTGGGTACAAGT 3240
3241 GGCAACCTGCTTCCATGGCCGTGTAGAAGCATGGTGCCTTGGCTTCTCTGAGGAAGCTGG 3300
3301 GGTTTCATGACAATGGCAGATGTAAAGTTATTCTTGAAGTCAGATTGAGGCTGGGAGACAG 3360
3361 CCGTAGTAGATGTTCTACTTTGTCTGTGCTGTTCTCTAGAAAGAATATTTGGTTTTCTGT 3420
3421 ATAGGAATGAGATTAATTCCTTTCCAGGTATTTTATAATTC'TGGGAAGCAAAACCCATGC 3480
3481 CTCCCCCTAGCCATTTTTTACTGTTATCCTATTTAGATGGCCATGAAGAGGATGCTGTGAA 3540
3541 ATTCCCAACAAACATTGATGCTGACAGTCATGCAGTCTGGGAGTGGGGAAGTGATCTTTT 3600
3601 GTTCCCATCCTCTTCTTTTAGCAGTAAAAATAGCTGAGGGAAAAGGGAGGGAAAAGGAAGT 3660
3661 TATGGGAATACCTGTGGTGGTTGTGATCCCTAGGTCTTGGGAGCTCTTGGAGGTGCTGT 3720
3721 ATCAGTGGATTTCCCATCCCTGTGGGAAATTAGTAGGCTCATTTACTGTTTTAGGTCTA 3780
3781 GCCATGTGGATTTTTTCTTAACATACCTAAGCAAACCCAGTGTCAGGATGGTAATCTT 3840
3841 ATTCCTTCGTTCAAGTTAAGTTTTTCCCTTCATCTGGGCACTGAAGGGATATGTGAAACAA 3900
3901 TGTTAACATTTTGGTAGTCTTCAACCAGGGAATTGTTTCTGTTAACTTCTTATAGGAAA 3960
3961 GCTTGAGTAAAAATAATATTGTCTTTTGTATGTCAACCaaaaaaa 4009

FIG. 7a(suite)

FIG. 7b

FIG. 8

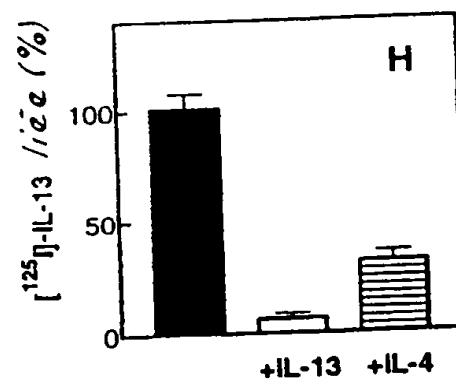
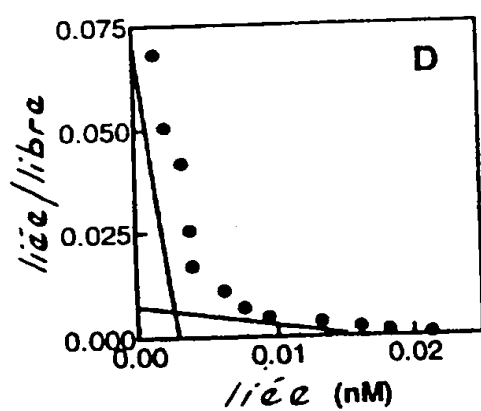
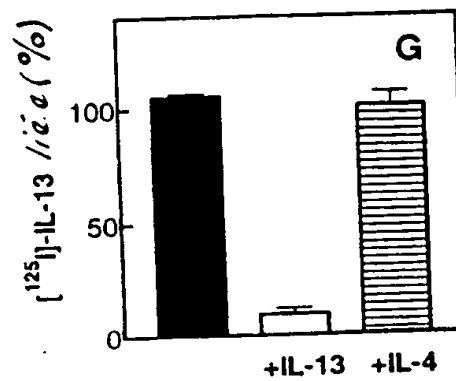
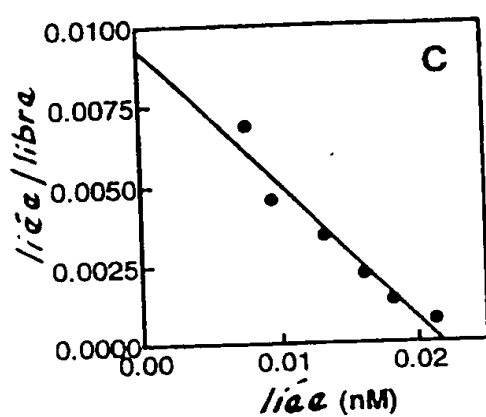


FIG.8 (suite)

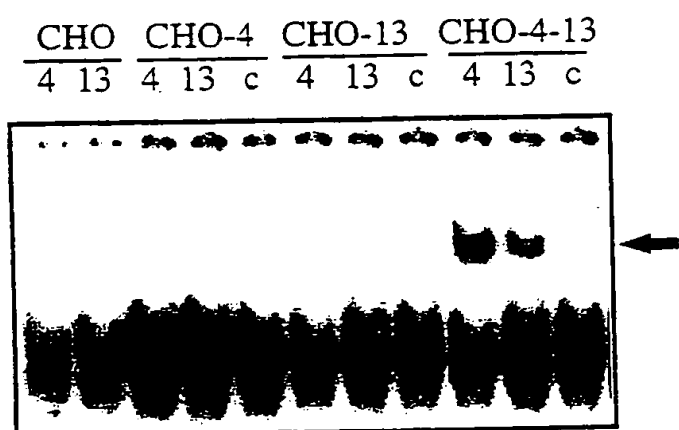


FIG.9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 96/01756

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/12 C07K14/715 C12N15/85 C12N5/10 C12Q1/68
C12N15/11 G01N33/53 C07K16/28 G01N33/577 G01N33/68
A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C07K C12Q G01N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FEBS LETTERS, vol. 366, no. 2-3, 12 June 1995, AMSTERDAM, PAYS-BAS, pages 122-126, XP002010891 S. LEFORT ET AL.: "IL-13 and IL-4 share signal transduction elements as well as receptor components in TF-1 cells." cited in the application see abstract * discussion *	8,9,11, 12,35,40

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- * "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * "E" earlier document but published on or after the international filing date
- * "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

* "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

* "A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 February 1997

Date of mailing of the international search report

11. 03. 97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. Application No
 PCT/FR 96/01756

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 8, 24 February 1995, BALTIMORE, MD, ÉTATS-UNIS, pages 3512-3517, XP002010892 N. VITA ET AL.: "Characterization and comparison of the interleukin 13 receptor with the interleukin 4 receptor on several cell types." cited in the application see abstract</p> <p>---</p>	8,9,11, 12,35,40
A	<p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 15, 14 April 1995, BALTIMORE, MD, ÉTATS-UNIS, pages 8797-8804, XP002010893 N. OBIRI ET AL.: "Receptor for interleukin 13." cited in the application see abstract</p> <p>---</p>	8,9,11, 12, 31-36, 40,43
A	<p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 23, 9 June 1995, BALTIMORE, MD, ÉTATS-UNIS, pages 13869-13878, XP002010894 S. ZURAWSKI ET AL.: "The primary binding subunit of the human interleukin-4 receptor is also a component of the interleukin-13 receptor." see abstract see discussion</p> <p>---</p>	8,9,11, 12
P,X	<p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 46, 15 November 1996, BALTIMORE, MD, ÉTATS-UNIS, pages 29265-29270, XP002025818 M. JAVAD AMAN ET AL.: "cDNA cloning and characterization of the human interleukin 13 receptor alpha chain." see figures 1,2 see abstract</p> <p>---</p>	8,9,11, 12,14, 16,17, 21-23, 25-30, 35,40
P,X	<p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 28, 12 July 1996, BALTIMORE, MD, ÉTATS-UNIS, pages 16921-16926, XP002025819 D. CAPUT ET AL.: "Cloning and characterization of a specific interleukin (IL)-13 binding protein structurally related to the IL-5 receptor alpha chain." see figure 3 see abstract</p> <p>---</p>	1,2,5,6, 14-19, 29,30, 35,39
	<p>---</p> <p>-/--</p>	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int ional Application No
PCT/FR 96/01756

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>IMMUNOLOGY TODAY, vol. 17, no. 3, March 1996, AMSTERDAM, PAYS-BAS, pages 108-110, XP002010895 R. CALLARD ET AL.: "IL-4 and IL-13 receptors: are they one and the same?" see figure 1</p> <p>-----</p>	1-43

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. de Internationale No
PCT/FR 96/01756

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/12 C07K14/715 C12N15/85 C12N5/10 C12Q1/68
C12N15/11 G01N33/53 C07K16/28 G01N33/577 G01N33/68
A61K38/17

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C12N C07K C12Q G01N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents no. des revendications visées

A	FEBS LETTERS, vol. 366, no. 2-3, 12 Juin 1995, AMSTERDAM, PAYS-BAS, pages 122-126, XP002010891 S. LEFORT ET AL.: "IL-13 and IL-4 share signal transduction elements as well as receptor components in TF-1 cells." cité dans la demande voir abrégé * discussion *	8,9,11, 12,35,40
---	---	---------------------

-/-

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

20 Février 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

11. 03. 97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Nooij, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. de Internationale No
PCT/FR 96/01756

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 8, 24 Février 1995, BALTIMORE, MD, ÉTATS-UNIS, pages 3512-3517, XP002010892 N. VITA ET AL.: "Characterization and comparison of the interleukin 13 receptor with the interleukin 4 receptor on several cell types." cité dans la demande voir abrégé</p> <p>---</p>	8,9,11, 12,35,40
A	<p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 15, 14 Avril 1995, BALTIMORE, MD, ÉTATS-UNIS, pages 8797-8804, XP002010893 N. OBIRI ET AL.: "Receptor for interleukin 13." cité dans la demande voir abrégé</p> <p>---</p>	8,9,11, 12, 31-36, 40,43
A	<p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 23, 9 Juin 1995, BALTIMORE, MD, ÉTATS-UNIS, pages 13869-13878, XP002010894 S. ZURAWSKI ET AL.: "The primary binding subunit of the human interleukin-4 receptor is also a component of the interleukin-13 receptor." voir abrégé voir discussion</p> <p>---</p>	8,9,11, 12
P,X	<p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 46, 15 Novembre 1996, BALTIMORE, MD, ÉTATS-UNIS, pages 29265-29270, XP002025818 M. JAVAD AMAN ET AL.: "cDNA cloning and characterization of the human interleukin 13 receptor alpha chain." voir figures 1,2 voir abrégé</p> <p>---</p>	8,9,11, 12,14, 16,17, 21-23, 25-30, 35,40
P,X	<p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 28, 12 Juillet 1996, BALTIMORE, MD, ÉTATS-UNIS, pages 16921-16926, XP002025819 D. CAPUT ET AL.: "Cloning and characterization of a specific interleukin (IL)-13 binding protein structurally related to the IL-5 receptor alpha chain." voir figure 3 voir abrégé</p> <p>---</p>	1,2,5,6, 14-19, 29,30, 35,39

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. de Internationale No
PCT/FR 96/01756

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
T	<p>IMMUNOLOGY TODAY, vol. 17, no. 3, Mars 1996, AMSTERDAM, PAYS-BAS, pages 108-110, XP002010895 R. CALLARD ET AL.: "IL-4 and IL-13 receptors: are they one and the same?" voir figure 1</p> <p>-----</p>	1-43